F 1330

studii și cercetări de biochimie

1

TOMUL 21

1978

IANUARIE—IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 21, nr. 1, p. 1—130, 1978, București

SCBIAS—21, (1), 1978

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export – Import Presă, P. O. Box 136–137 telex: 11226, București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, P.O. Box 1002 București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, cod 71021.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 21, nr. 1 1978

IANUARIE—IUNIE

SUMAR

V. GHEŢIE, Nicolae Şt. Chişiu (1921—1977) 3

V. ARTENIE, V. DULMAN, S. FIŞEL, Influenţa Co (II). Fe(III), Zn(II) asupra biosintezei unor metaloenzime la *Spicaria violacea* 11

L. BOTOŞENEANU, C. IORDACHE, C. MUŞOLAN, S. VASU, Încercări de optimizare a mediului de cultură pentru fungul *A. niger*, în vederea obţinerii de acid citric 19

S. CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU, A. ŞTEFAN, E. IONIŢĂ, Acţiunea diazinonului asupra formării şi dezvoltării embrionilor de *Gallus domesticus* 27

N. CHEŢA, M. ŞERBAN, Comportarea catalazei eritrocitare în anemia hemolitică prin deficit de glucozo-6-fosfat dehidrogenază 31

N. CHEŢA, M. ŞERBAN, Variaţii cantitative ale glutationului redus şi oxidat în anemia hemolitică prin deficit de glucozo-6-fosfat dehidrogenaza 35

A. M. COANDĂ, P. MURGOCI, T. DIACONESCU, S. COMOROŞAN, Efectul iradierii piruvatului asupra activităţii enzimatice a lactat dehidrogenazei 39

S. MARCOVSCHI, D. CRIŞAN, S. VIERU, Investigarea lactatdehidrogenazelor din tumori cu substanţe iradiate 45

E. MOLDOVEANU, M. ŞERBAN, Matabolismul hormonilor estrogeni în funcţie de vîrstă şi sub acţiunea acidului N-acetil-tiazolidincarboxilic 51

G. MOŢA, Precipitarea fracţionată a IgA secretoare umană 59

G. NEAMŢU, G. ILLYES, Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare. X. Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din plante superioare acvatice 63

S. RĂDULESCU, E. ILICA, Z. MOLDOVEANU, Caracterizarea proteinelor extrase din nămolurile active normale şi intoxicate cu p-nitr-anilină 69

B. SEGAL, R. SEGAL, D. GEORGESCU, I. BARBU, R. AMARFI, C. VÂŢĂ, D. SĂHLEANU, Cercetări privind caracterizarea amidonului din mazăre 73

M. ŞUŢEANU, M. ŞERBAN, E. ŞUŢEANU, Comportarea unor enzime şi cationi din serul sanguin în leucoza bovină 83

M. TĂMAŞ, V. HODIŞAN, L. GRECU, E. FĂGĂRĂŞAN, M. BACIU, I. MUICĂ, Cercetări asupra saponinelor triterpenice din plante medicinale indigene 89

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, Carotinoide din insecte. V. Carotinoide din ouă, larve şi insecte adulte *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* (fam. *Coccinellidae*) 95

T. VĂLSĂNESCU, D. PARASCHIVESCU, S. ICHIMESCU, Cercetări privind unele aspecte biochimice ale lanţului trofic dintre *Cinara piceae* P. şi *Formica rufa* L. de pe molid 99

M. ZAMFIR-GRIGORESCU, S. VASU, Producerea celulazelor în tulpini şi mutante de *A. niger* cultivate în prezenţa unor surse diferite de azot şi carbon 103

REFERAT GENERAL

C. MUŞOLAN, C. IORDACHE, L. BOTOŞENEANU, S. VASU, Producerea acidului citric de către *Aspergillus Niger*. Aspecte teoretice şi practice 109

RECENZII 123

St. cerc. biochim., tomul 21, (1), p. 1—130, Bucureşti, (1978)

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 21, nr. 1 1978

IANUARIE – IUNIE

CONTENTS

V. GHEŢIE, N. St. Chişiu (1921–1977) 3

V. ARTENIE, V. DULMAN, S. FIŞEL, The influence of Co (II), Fe(III), ZN(II), on the biosynthesis of certain metaloenzymes in *Spicaria violacea* 11

L. BOTOŞENEANU, C. IORDACHE, C. MUŞOLAN, S. VASU, Attempts for optimization of culture medium for citric acid production by *Aspergillus niger* 19

S. CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU, A. ŞTEFAN, E. IONIŢĂ, Action de diazinon sur la formation et le developpement des embryons de *Gallus domesticus* 27

N. CHEŢA, M. ŞERBAN, L'investigation de la catalase erytrocytaire dans l'anémie hemolytique par deficit de G–6–PDH 31

N. CHEŢA, M. ŞERBAN, Variations quantitatives du glutathion reduit et oxidé dans l'anémie hemolytique par deficit de G–6–PDH 35

A. M. COANDĂ, P. MURGOCI, T. DIACONESCU, S. COMOROŞAN, The effect of pyruvate irradiation on the lactate-dehydrogenase activity 39

S. MARCOVSCHI, D. CRIŞAN, S. VIERU, Investigation of tumor lactatdehydrogenases with irradiated substrates 45

E. MOLDOVEANU, M. ŞERBAN, The metabolism of estrogen hormones as a function of age and under the action of N-acetyltiazolydincarboxylic acid 51

G. MOŢA, Stepwise precipitation of human secretory IgA 59

G. NEAMŢU, G. ILLYES, Chemotaxonomic researches in higher plants. X. Carotenoid and chlorophyll pigment in aquatic higher plants 63

S. RĂDULESCU, E. ILICA, Z. MOLDOVEANU, Protein caracterization of normal and p-nitr-aniline intoxicated active sludges 69

B. SEGAL, R. SEGAL, D. GEORGESCU, I. BARBU, R. AMARFI, C. VÂŢĂ, D. SĂHLEANU, Untersuchungen zur kennzeichnung der erbsenstarke 73

M. ŞUŢEANU, M. ŞERBAN, E. ŞUŢEANU, The behaviour of certain enzymes and cations in the blood serum in bovine leucosis 83

M. TĂMAŞ, V. HODIŞAN, L. GRECU, E. FĂGĂRĂŞAN, M. BACIU, I. MUICĂ Investigations on triterpenoid saponins in medical indigenous plants 89

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, Insect carotenoids. V. Carotenoids from eggs, larvae, and beetles of *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* (fam. *Coccnellidae)* 95

T. VĂLSĂNESCU, D. PARASCHIVESCU, S. ICHIMESCU, Certain biochemical aspects of nutrition relationship between *Cinara piceae* P. and spruce-fir *Formica rufa* L. 99

M. ZAMFIR-GRIGORESCU, S. VASU, The production of cellulolytic enzymes in strains and mutants of *A. niger* grown in the presence of different sources of nitrogen and carbon 103

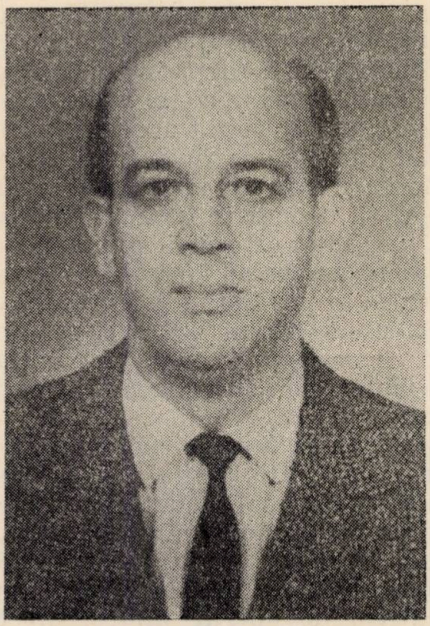
GENERAL REPORT

C. MUŞOLAN, C. IORDACHE, L. BOTOŞENEANU, S. VASU, Production of citric acid by *Aspergillus Niger*. Theoretical and practical aspects 109

REVIEWS 123

St. cerc. biochim., tomul 21, (1), p. 1–130, Bucureşti, (1978)

NECROLOG



NICOLAE ŞT. CHIŞIU

1921 – 1977

La 4 martie 1977 a decedat în mod tragic dr. N. Şt. Chişiu, şeful laboratorului de medicină experimentală şi imunologie de la spitalul clinic „Dr. I. Cantacuzino" din Bucureşti.

S-a născut la 11 aprilie 1921 în comuna Bădăcin din judeţul Sălaj. În 1940, după ce absolvă liceul „Simion Bărnuţiu" din Şimleul-Silvaniei, se înscrie la Facultatea de Medicină Veterinară din Bucureşti, fiind numit încă din anul 1945 preparator la catedra de anatomie comparată. Orientarea spre patologia umană îl aduce pe dr. N. Şt. Chişiu în sfera cercetărilor experimentale dedicate biochimiei clinice şi imunologiei, fiind integrat în laboratoarele spitalului „Dr. I. Cantacuzino" din Bucureşti. Aici, în 1957, înfiinţează şi organizează prin puteri proprii un laborator de medicină experimentală asociat clinicii de nutriţie condusă de profesorul I. Pavel. În acest laborator dr. N. Şt. Chişiu îşi va efectua principalele sale cercetări de imunochimie şi imunopatologie, timp de două decenii. Deşi dotarea laboratorului său nu s-a putut niciodată compara cu cea a laboratoarelor din institutele de cercetări medicale

sau a marilor clinici din București, acest fapt nu l-a împiedicat să efectueze cercetări care l-au situat între cei mai buni imunologi români. Originalitatea gîndirii sale și neobișnuita sa inventivitate ca om de laborator au compensat integral absența aparaturii complexe, generînd necontenit contribuții semnificative, cu o înaltă ținută științifică.

Doctorul N. Șt. Chișiu utiliza, la fel ca și alți cercetători, metode analitice bazate pe imunodifuzie drept instrument principal de abordare a variatelor domenii de investigare alese. Dar nu cunosc nici o cercetare științifică publicată care să fi utilizat aceste tehnici cu mai mult rafinament și discernămînt; în mîinile doctorului Chișiu aceste metode de analiză s-au transformat într-un instrument multipotent, sensibil și riguros, destinat culegerii unor date imunochimice asupra macromoleculelor, date care sînt furnizate, de obicei, prin aplicarea unor metodologii complicate și costisitoare. Susținînd ideea că cele mai complete date asupra structurii antigenice se pot obține prin reacții antigen-anticorp care au loc în spațiul tridimensional și sînt vizibile cu ochiul liber, dr. N. Șt. Chișiu a demonstrat prin întreaga sa operă că ochiul și judecata sînt și astăzi, în epoca calculatoarelor, instrumente de neînlocuit ale cercetării științifice biomedicale.

Spirit eliberat de tirania drumurilor bătătorite în știință dr. N. Șt. Chișiu s-a mișcat cu dezinvoltură și siguranță în domenii atît de variate de cercetare încît în epoca noastră numai prin excepție ele pot fi acoperite de un singur om într-o muncă limitată la două decenii.

Parcurgînd creația științifică lăsată de dr. N. Șt. Chișiu în perioada 1957—1977 cititorul este izbit de abordarea sistematică și în profunzime a unor probleme extrem de diferite dintre care citățm : organogeneza și mecanostructura funcțională a unor segmente din sistemul osos, rolul factorilor hemodinamici (a „curenților de agresiune") în leziunea ateromatoasă, apariția litiazei biliare în avitaminoza C, structura antigenică a proteinelor biliare și evidențierea anticorpilor specifici în icterul colostatic, cenzura proteinoclazică și transportul trans-intestinal de proteine, evidențierea unei subclase noi de IgA la om, caracterizarea unor subclase noi de beta-lipoproteine serice și măsurarea capacității lor de a transporta lipidele, relații filogenetice între batracieni, păsări și mamifere reflectate în structura antigenică a unor proteine, influența dietei colesterolice asupra metabolismului proteic și a reactivității imunologice a animalelor purtătoare de aterom, mecanismul de acțiune a unor hipoglicemiante asupra metabolismului glucozei la animale diabetice (aloxanizate), cercetări imunochimice asupra unor viroze și bacterioze la animalele domestice, rolul imunoglobulinei secretoare și a lactoferinei în protecția mucoaselor, izolarea și identificarea unor substanțe de origină vegetală capabilă să reacționeze cu IgG umană și animală și altele.

Doctorul N. Șt. Chișiu a aparținut acelei categorii de oameni de știință care sînt necontenit preocupați de validarea și fructificarea rezultatelor obținute prin aplicarea lor în practică. De aceea, multe din cercetările sale, și în special cele de imunochimie, au condus la elaborarea unor tehnologii noi care materializează, sub forma a peste 25 de brevete de invenție, efortul său de a extinde aplicațiile imunologiei în sfera industrială, pentru controlul imunochimic al alimentelor, furajelor și produselor apicole. Moartea la surprins pe dr. N. Șt. Chișiu într-o febrilă activitate

de aplicare în domeniul medical a reactivilor de origină vegetală, descoperiți de el, care pot substitui anticorpii în reacția de vizualizare a IgG umane și animale și pot influența favorabil recrutarea celulelor imunocompetente în procesul de intervenție imunologică.

★

Din bogata activitate științifică a dr. N. Șt. Chișiu vom desprinde în cele ce urmează doar contribuția la caracterizarea sistemului secretor biliar. Cercetările sale au atestat că arborizarea biliară intrahepatică constituie o glandă cu secreție externă asociată ficatului și că ea apare în cazuri patologice ca țintă a unei autoagresiuni imunologice care este declanșată de penetrarea antigenelor specifice biliare în sfera de recunoaștere a nonselfului din organism. Dr. N. Șt. Chișiu a descoperit că celulele din epiteliul biliar sintetizează un grup de proteine specifice pe care le exportă în bilă și sînt deci excretate în intestin odată cu bila. Cercetările, efectuate concomitent pe iepure și pe om, au condus la identificarea unui grup de antigene biliare ca entități moleculare distincte. S-a putut stabili că antigenele biliare sînt autoimunogenice și că pot iniția și întreține un proces de autoimunizare. Acest proces de autoimunizare a fost implicat de dr. N. Șt. Chișiu în patologia ficatului fiind cauza unor suferințe hepatice cu evoluție spre ciroză. Inițierea autoimunizărilor se realizează prin colestază sau prin malabsorbție ocazionată de insuficiențe proteazice în intestinul subțire. Această interpretare nouă a fost demonstrată prin studii experimentale efectuate pe iepuri la care s-a indus o ciroză hepatică prin factori umorali și celulari autoagresivi, elicitați de antigenele biliare proprii pătrunse în circulație. Acest model experimental a fost verificat și în alte laboratoare, de exemplu în cel al prof. H. Popper de la Mount Sinai School of Medicine din New York. Prezența autoanticorpilor anti-biliari în circulația sanguină la om atestă existența unei stări clinice de autoagresiune hepatică cu adresă specială către arborizația biliară. Rezultatele obținute au indicat că procesul de autoagresiune poate fi detectat prin dozarea anticorpilor anti-antigene biliare sau prevenit prin supravegherea stărilor de colestază și maldigestie proteică. Aceste concluzii au pătruns aproape imediat în sfera aplicațiilor clinice sub forma unor procedee brevetate, de diagnostic a colestazei — prin dozarea antigenului biliar în circulație, de diagnostic a unei stări de autoagresiune — prin dozarea anticorpilor anti-biliari, de detectare și control a stărilor de maldigestie proteică precum și de drenaj biliar.

Chiar această prezentare sumară a rezultatelor obținute de dr. N. Șt. Chișiu în perioada 1965—1972 și materializate într-o suită de 15 articole publicate mai ales în revistele de biochimie demonstrează convingător capacitatea sa inegalabilă de a aborda sintetic probleme complicate prin mijloace de investigație simple, integrate în modele experimentale pe cît de semnificative pe atît de elegante. De aceea citirea cărții sale nepublicate „Arborizația biliară din ficat ca glandă cu secreție externă specifică", care reunește toate cercetările sale din acest domeniu lasă mpresia unei opere profund originale care ar merita să fie nu numai răspîndită dar și continuată.

★

Dr. N. Șt. Chișiu va rămîne în memoria celor care l-au cunoscut ca un om de o rară modestie, potrivnic oricărei acțiuni care să-l aducă în centrul atenției generale. De aceea se manifesta rar în ședințe publice de comunicări, fidel convingerii sale că actul de creație se consumă în laborator și se exprimă în lucrări scrise. Deviza sa „omul de știință trebuie să scrie opere nu să le cînte" este caracteristică pentru un om care și-a petrecut cea mai mare parte a vieții în laborator și care dezaproba, prin tăcere, prea marea grabă a unora de a anunța rezultate de efect dar cu durată efemeră.

Darnic cu ideile și cu observațiile sale experimentale, regăsim generozitatea dr. Chișiu înscrisă în zeci de lucrări științifice, teze de doctorat și cărți de specialitate semnate de colegii săi mai tineri întru ale științei. Întotdeauna gata să ajute cu o încurajare, un sfat sau un experiment pe cei mulți care i-au urcat treptele laboratorului, dr. N. Șt. Chișiu a aparținut acelei categorii alese de oameni care au întotdeauna timp și disponibilitate sufletească pentru alții. De aceea nimeni nu a stat în picioare în laboratorul său și foarte puțini au plecat altfel decît copleșiți de o generozitate care nu cerea răscumpărare, oferită cu un tact și cu o delicateță sufletească împinse pînă la uitarea de sine.

Dispariția doctorului Chișiu va constitui multă vreme o dureroasă absență pentru toți cei care l-au cunoscut cu adevărat și este o piedere ireparabilă pentru comunitatea științifică a imunologilor români. Fără dr. Nicolae Chișiu viața noastră științifică este lipsită de un model și va fi mai săracă și considerabil mai rece.

Victor Gheție
Institutul „V. Babeș",
București

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ *

1. *L'électrophorèse du sèrum sanguin dans les avitaminoses expérimentales.* La Semaine des Hôpitaux *34*, 1, 1958.
2. *Studiul electroforetic al disproteinemiilor din avitaminozele A, B, C, D experimentale.* Med. Internă *10*, 183, 1958.
3. *Disproteinemia din sindromul umoral al ateromatozei experimentale la iepure: hipergammaglobulinemia.* Med. Internă *13*, 265, 1961.
4. *Efectul disnutriției maidice asupra dezvoltării descendenților concepuți după vindecarea clinică.* St. Cerc. Med. Internă *3*, 647, 1962.
5. *Influența dietei aterosclerogene asupra nivelului unor aminoacizi liberi din ser la iepure.* Fiziol. norm. patol. *9*, 261, 1963.
6. *Studiu imunochimic al globulinei „anormale" (Componenta M) din unele seruri sanguine patologice. I. Raportul „componentei M" cu fracțiunile proteice comune în serul sanguin.* Med. Internă *15*, 485, 1963.
7. *Aspecte histochimice în ficat la șoarecii hibrizi cu obezitate spontană.* Morfol. norm. patol. *11*, 6, 1966,

* Au fost selecționate numai lucrările de biochimie clinică, imunochimie, imunologie și morfopatologie. Întocmirea acestei liste bibliografice nu ar fi fost posibilă fără munca competentă a farmacistelor Mioara Rădulescu și Aurica Corâci de la OSIM care au colectat și clasificat lucrările dr. N. Șt. Chișiu.

8. *The role of a haemodynamic factor in determining the site of atheromatous lesions.* Agression streams in the blood flow. (in) Diabetische Angiopathie (Ed. G. Möhnike), Akad. Verlag, Berlin, 1964, pg. 169.
9. *Action des graisses végétales sur l'athérosclérose expérimentale.* Nutr. Dieta *6*, 106, 1964.
10. *Relații între patologia cutanată și focarul de infecție amigdalian.* Oto-Rino-Laringologie *9*, 129, 1964.
11. *Effet de la chaleur sur l'action antiathérogène de l'huile de tournesol chez le lapin.* Med. Internă *16*, 463, 1964.
12. *Recherches concernant le mécanisme d'action du diméthylbiguanidine sur le métabolisme du glucose chez le rat diabétique (alloxanisé).* Med. Internă *16*, 361, 1964.
13. *Ulcer gastric, ulcer duodenal și deficiențe în sinteza colagenului la cobaiul scorbutic.* Morfol. norm. patol. *10*, 5, 1965.
14. *Constituienți antigenici proprii și de origine sanguină în bilă hepatică și veziculară umană.* Studiu imunoelectroforetic. St. cerc. biochim. *8*, 472, 1965.
15. *Despre originea celulelor spumoase (foam cells) din ateromul de iepure și dependența de hipercolesterolemie a apariției lor în placă.* St. Cerc. Med. Internă *6*, 93, 1965.
16. *Athérome à évolution prolongée (cinq ans) du lapin soumis à une diète cholestérolique intermittente.* Med. Internă *17*, 255, 1965.
17. *Étude sur le macrophage de l'athérome expérimental du lapin. Le rôle de la cholestérolémie dans l'apparition et la progression des lésions.* Rev. Roum. Med. Int. *2*, 93, 1965.
18. *Procedee de gastrotehnie și despecificarea antigenică a unor proteine alimentare solubile. Tratarea termică a laptelui în diferite condiții de pH.* Med. Internă *22*, 501, 1970.
19. *Scăderea semnificativă a lipoproteinelor rapide în serul sanguin la icterici.* Med. Internă, *22*, 49, 1970.
20. *Germes et protéines de métabolisme spécifique dans le diagnostic de certaine parasitoses. II. Immuno-électrophorèse différentielle dans la spirochétose des Oiseaux.* Rev. Méd. Vét. *148*, 473, 1973.
21. *Discrinia biliară în litiaza experimentală cu 3-β-colestanol.* Med. Internă, *23*, 12, 1966.
22. *Étude de quelques fractions protéique de la périlymphe immunologiquement similaires aux fractions respectives du sérum sanguin, de la bile, du lait et du liquide céphalo-rachidien.* Ann. Oto-Laryng. (Paris) *83*, 741, 1966.
23. *Considerații asupra fiziopatologiei icterului din ficatul gras.* St. Cerc. Med. Internă 7, 335, 1966.
24. *Influența insulinei și a dimetilbiguanidinei asupra glucozei sanguine și a glicogenului hepatic sau muscular.* St. Cerc. Med. Internă 7, 173, 1966.
25. *Leziuni experimentale de tip ateromatos pe vena de iepure.* Aspecte structurale topografice și hemodinamice. St. Cerc. Med. Internă 7, 55, 1966.
26. *Cenzura proteinoclazică în absorbția de proteine și polipeptide din intestin.* St. cerc. biochim. *9*, 269, 1966.
27. *The immunoelectrophoretical research of the blood serum proteins in the gallbladder bile in the scorbutic guinea pig in connection with the gallstones.* Rev. roum. Biochim. *3*, 311, 1966.
28. *La dyscrinie de la lithiase biliaire expérimentale au 3-bétacholestanol.* Archives Françaises des Maladies de l'Appareil Digestif, *55*, 385, 1966.
29. *Cercetarea unor componente din grupul beta-globulinelor în sîngele din cordonul ombilical uman.* Studiu comparativ cu sîngele matern. Pediatria *15*, 3, 1966.
30. *Lésions expérimentales de type athéromateux sur les veines de lapin.* Aspects structuraux, topographiques et hémodynamiques. Rev. roum. Méd. Internă *3*, 35, 1966.
31. *Constituants antigéniques propres et d'origine sanguine dans la bile hépatique et vésiculaire humaine.* Étude immuno-électrophorétique. Rev. roum. Biochim. *3*, 207, 1966.
32. *The neoductuli in the rabbit liver with dietary, experimental icterogenic steatosis (Chisiu type) (Histochemical and histoenzymatic study).* Acta histochem. *28*, 197, 1967.
33. *Retention and degradation of fluorescent human albumin by the small intestine of rats perfused „In Situ".* Rev. roum. Biochim. *4*, 119, 1967.
34. *Relații filogenetice între batracieni, păsări și mamifere (inclusiv om), reflectate în grupările antigenic-determinante ale unor proteine (Studiu de imunogenetică).* St. cerc. biochim. *10*, 105, 1967.
35. *Distribuția și modificarea antigenicității albuminei umane fluorescente, reținută în organele, celulele și umorile unor animale de experiență.* St. cerc. biochim. *10*, 19, 1967.
36. *Absorbție intestinală de componente antigenice în tulburări digestive consecutive de nutriției.* St. cerc. biochim. *10*, 205, 1967.

37. *Constituants protéiques de la bile vésiculaire de lapin en relation avec une activité de synthèse spécifique de l'épithélium biliaire.* Rev. roum. Méd. Int. *4*, 433, 1967.
38. *Prezența semnificativă a unor proteine sanguine în constituția calculilor biliari și în precipitatul biliar amorf de la cobaiul scorbutic.* St. Cerc. Med. Internă *8*, 535, 1967.
39. *Experimental investigations on immunology of the parathyroid gland.* Immunology *14*, 475, 1968.
40. *„Furtuna" fibrinolitică, un accident grav al postului la obezi.* Viața Medicală *15*, 20, 1968.
41. *Prezența unor componente antigenice specifice în bila de iepure și apariția acestor substanțe în serul sanguin în cursul icterului colostatic.* St. Cerc. Med. Internă *9*, 553, 1968.
42. *Studiu imunochimic comparativ al IgA din colostru, bilă și din serul sanguin de iepure.* St. cerc. biochim. *11*, 11, 1968.
43. *Aspects morphologiques suggérant la modalité de transfer (absorption) de quelques protéines dans l'intestin du rat adulte,* Rev. roum. Med. Int. *5*, 65, 1968.
44. *La lithiase biliaire chez le cobaye avec dysnutrition scorbutique.* Nutr. Dieta *11*, 60, 1969.
45. *O nouă clasă de lipoproteine — componentă normală a serului sanguin uman: Lipoproteinele ultra-lente.* St. Cerc. Med. Internă *10*, 445, 1969.
46. *Composant spécifique biliaire, identique du point de vue antigénique, chez le cercophithecus et chez l'homme. Corrélations avec la pathologie hépatique.* Rev. roum. Biochim. *6*, 7, 1969.
47. *Clinical-surgical aspects of tympanosclerosis bearing the imprint of immunoaggressive phenomena.* International audiology *9*, 238, 1970.
48. *Aspecte clinice și imunochimice într-un caz de mielom multiplu asociat cu o creștere serică a imunoglobulinelor de tip IgD.* Med. Internă *22*, 10, 1970.
49. *Homologous molecular translocations and a critique of immuno-fluorescence methods applied to swine fever virus.* Archiva veterinaria *7*, 21, 1970.
50. *Infective viral bodies in the blood serum and their demonstration by differential immuno-electrophoresis, electron microscopy and specific infectivity.* Archiva Veterinaria *7*, 6, 1970.
51. *Noi clase de imunoglobuline în secreția lacrimală și în bila de iepure.* St. Cerc. Med. Int. *11*, 71, 1970.
52. *Proliferare neoductulară și aspecte imuno-agresive în icterul colostatic experimental la iepure.* St. Cerc. Med. Internă *11*, 315, 1970.
53. *Étude morphologique et immunochimique de la cholestase intrahépatique dans l'ictère expérimental (nutritionnel) du lapin.* Rev. roum. Méd. Interne *7*, 285, 1970.
54. *Susceptibilitatea diferită a imunoglobulinelor A umane de tip seric și secretor la hidroliza cu papaină. Speculații asupra capacității „piesei secretoare" de a proteja molecula de IgA de acțiunea enzimelor proteolitice din secreții.* St. cerc. biochim. *14*, 371, 1971.
55. *Control of deviated metabolic pathways in diabetes through modulation of enzymic activation.* Rev. roum. Méd. Int. *8*, 199, 1971.
56. *Transporteurs sanguins d'insuline antigéniquement disponible (α_1-Globuline) et antigéniquement masquée (α_2 M-Globuline et β_1-Lipoprotéine).* Rev. roum. Méd. Int. *8*, 53, 1971.
57. *Test de imunoelectroprecipitare cantitativă aplicat în diagnosticul pestei porcine.* Rev. zootehnie și med. veterinară *7*, 425, 1971.
58. *Impregnația cu imunoglobuline în corionul mucoasei reacționate din otita medie cronică.* „Clujul Medical" *15*, 4, 1971.
59. *Le pouvoir réactif et aspects cellulaires de la muqueuse de l'oreille moyenne chez le nouveau-né.* Minerva Otorinolaringologica *21*, 158, 1971.
60. *Appreciation de la concentration relative d'un antigene du complexe moleculaire du serum sanguin de porc par l'immunoosmophorese quantitative* Archiva Veterinaria *8*, 1, 1971.
61. *The dependent phenotype expression of a Hog serum globulin correlated with some virus-induced diseases.* Archiva Veterinaria *8*, 55, 1971.
62. *Fibroză inelară și septală în ficatul iepurelui cu icter colostatic indus experimental prin dietă.* St. Cerc. Med. Internă *12*, 57, 1971.

63. *Serum and secretory IgA's in chronic otitis media. An* ***immunoelectrophoretic*** *and clinical study.* Minerva Otorinolaringologica. *22*, 205, **1972.**
64. *Semnal imunoreactiv în ser la tineri cu amigdalită* ***cronică: disocierea*** *componentului C3a al complementului.* Oto-Rino-Laringologia *17*, **6, 1972.**
65. *Transudat și secreție în otita medie seroasă. Criterii* ***imunochimice*** *diferențiale.* Oto-Rino-Laringologia *17*, 321, 1972.
66. *Aspecte funcționale ale mucoasei din urechea medie.* ***Identificarea*** *imunochimică a lactoferinei în secreții auriculare.* Oto-Rino-Laringologia *17*, **251, 1972.**
67. *Bile specific protein autoantibodies in the human* ***blood serum.*** Rev. roum. Biochim. *9*, 103, 1972.
68. *A new IgA subclass identified in human serum and* ***colostrum.*** Comparative immunoelectrophoretic study. Rev. roum. Biochim. *9*, **17, 1972.**
69. *Immunoglobulins and immunocompetent activity in* ***the human middle ear.*** Minerva Otorinolaringologica *23*, 240, 1973.
70. *Two myeloma IgA subclasses in human serum.* ***Comparative*** *immunoelectrophoretic study.* Rev. roum. Biochim. *11*, 229, 1974.
71. *IgA seric și secretor la bolnavi cu otită medie cronică.* ***Cercetări imunochimice.*** Oto-Rino-Laringologia *18*, 1, 1973.
72. *Apo-Lipo-Beta and its subanophil chargo with* ***distinctive variability*** *in the human blood serum.* Rev. roum. Biochim. *12*, 75, **1975.**
73. *Apo-Lipo-Beta subclasses in human blood serum.* ***Distinctive antigenicity*** *and some functions.* Rev. roum. Biochim. *12*, 81, 1975.

INFLUENŢA CO(II), FE(III), ZN (II) ASUPRA BIOSINTEZEI UNOR METALOENZIME LA *SPICARIA VIOLACEA*

VLAD ARTENIE, VIORICA DULMAN, SIMON FIŞEL

Rezumat. S-a studiat influenţa ionilor de Co(II), Zn(II), Fe(III) asupra biosintezei fosfatazei alcaline, catalazei şi peroxidazei în celulele de *Spicaria violacea*, în condiţii diferite de pH, concentraţie, timp, în scopul elucidării mecanismului concentrării ionilor cu acest colector microbiologic.

Ciuperca *Spicaria violacea* manifestă proprietăţi de colector microbiologic, posedînd capacitatea de a concentra ionii metalici din soluţii diluate [1, 2, 3]. Studiindu-se izoterma de absorbţie a cationului metalic pe suprafaţa miceliului ciupercii s-a constatat că adsorbţia este neglijabilă [1], fapt care ar pleda pentru explicarea mecanismului concentrării elementelor din soluţie diluată, prin acumularea lor în interiorul celulelor microorganismului. Înglobarea ionilor metalici în celula microbiană se poate explica prin participarea lor drept constituenţi ai centrilor activi din molecula diferitelor metaloenzime, prin fixarea lor de anumiţi componenţi ai membranelor intracelulare sau prin simpla depozitare sub formă liberă în citoplasmă.

Între metaloenzimele tipice se numără fosfataza alcalină (EC 3.1.3.1) care conţine în centrul său activ ioni de zinc [4], apoi catalaza (EC 1.11.16) şi peroxidaza (EC 1.11.1.7), a căror grupare prostetică este feriprotoporfirina IX. Atît fosfatazele cît şi oxidoreductazele menţionate îndeplinesc un rol important în procesul de respiraţie şi oxidare a substanţelor organice în celulele microorganismelor. Studiul metaloenzimelor prezintă un interes deosebit şi în legătură cu elucidarea mecanismelor fine implicate în concentrarea cationilor din soluţii diluate.

În prezenta lucrare se studiază influenţa ionilor de Co(II), Zn(II) şi Fe(III) asupra biosintezei fosfatazei alcaline, catalazei şi peroxidazei în celulele ciupercii *Spicaria violacea*, cultivată pe medii nutritive, conţinînd aceşti ioni metalici, în condiţii diferite de pH, concentraţie şi timp.

MATERIAL ŞI METODĂ

Ciuperca *Spicaria violacea* a fost cultivată pe mediul menţionat în lucrările anterioare [1, 2, 3]. Biomasa separată de lichidul de cultură, prin filtrare pe hîrtie de filtru cantitativă şi spălată de 2—3 ori cu apă bidistilată, a servit pentru determinarea substanţei uscate şi ca sursă de enzime.

Determinarea substanţei uscate s-a efectuat prin cîntărirea unei anumite cantităţi de biomasă înainte şi după uscare la 100—105°C, pînă la greutate constantă.

Pentru extracţia enzimelor o cantitate determinată de biomasă s-a mojarat cu sticlă pisată, mojarul fiind menţinut pe gheaţă. Omogenatul rezultat a fost diluat cu apă bidistilată

răcită la 4°C (1 g biomasă umedă : 10 ml apă bidistilată). Suspensia obţinută s-a centrifugat 15 minute la 3500 rot/min, la o centrifugă cu răcire. În supernatantul separat s-au dozat activitatea enzimelor şi conţinutul de proteine.

Activitatea fosfatazei alcaline s-a determinat după cantitatea de fosfor anorganic eliberat în urma acţiunii extractului enzimatic asupra unei soluţii tamponate de beta-glicerofosfat de sodiu cu pH 8,6 prin incubare timp de 30 minute la 37°C. Activitatea fosfatazei alcaline s-a exprimat în micrograme de fosfor scindat de la substrat, iar activitatea specifică în micrograme de fosfor eliberat de 1 mg protein-enzimă.

Pentru determinarea activităţii catalazei s-a folosit metoda titrimetrică cu tiosulfat de sodiu [5]. Ca unitate catalazică se consideră acea cantitate de enzimă care descompune un micromol de H_2O_2 în timp de 5 minute, la temperatura de 20° C. Activitatea specifică s-a exprimat în unităţi catalazice per 1 mg de proteină.

Determinarea activităţii peroxidazei s-a realizat după metoda [6], care se bazează pe capacitatea enzimei de a oxida benzidina la para-difenochinondiimină, cu formarea unui compus colorat. Activitatea peroxidazei s-a exprimat în unităţi convenţionale de extincţie. Pentru calcularea activităţii specifice se raportează numărul de unităţi peroxidazice la 1 mg de proteină.

Dozarea proteinelor s-a efectuat prin metoda fotocolorimetrică cu reactivul Folin-Ciocîlteau [7], folosind albumina serică pentru construirea curbei etalon.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinările s-au efectuat numai pe extractul obţinut din biomasa de *Spicaria violacea*, deoarece activitatea enzimelor investigate în lichidul de cultură este neglijabilă. Fiecare rezultat reprezintă media a 3—5 determinări paralele. Erorile experimentale nu se abat mai mult de ±4%.

Influenţa pH-ului mediului de cultură asupra biosintezei fosfatazei alcaline, catalazei şi peroxidazei la Spicaria violacea în prezenţa ionilor de Co (II), Zn (II) şi Fe (III). Unul din factorii importanţi care poate influenţa biosinteza enzimelor la microorganisme este pH-ul mediului de cultură. Figura 1 ilustrează influenţa pH-ului mediului de cultură asupra biosintezei fosfatazei alcaline la *Spicaria violacea* cultivată în prezenţa ionilor de Co (II), Zn (II) şi Fe (III), luaţi în concentraţie de 6,68, 5,45 şi respectiv 6,78 μg/ml, aceste valori ale concentraţiei cationilor fiind optime pentru dezvoltarea ciupercii [2] şi biosinteza enzimelor studiate, aşa cum se va arăta mai departe. În paralel s-au efectuat probe de control în care ciuperca s-a dezvoltat pe medii fără ionii metalici menţionaţi. Din figura 1 (curbele I, II, III) se observă că în probele martor biosinteza fosfatazei alcaline la *Spicaria violacea*, determinată după diferite perioade de cultură a ciupercii, se realizează cel mai intens la pH 7. Adăugarea ionilor de Co (II), Zn (II) sau Fe (III) în mediul de cultură pentru dezvoltarea ciupercii (fig. 1, curbele IV, V, VI), determină o puternică stimulare a biosintezei fosfatazei alcaline. De remarcat că ionul Co(II) produce în acelaşi timp cu stimularea şi deplasarea pH-ului optim al biosintezei enzimei de la 7 la 6, datorită probabil complexării ionului metalic cu diferite grupări din molecula proteică. În prezenţa ionului Fe(III) există o slabă dependenţă între biosinteza fosfatazei alcaline la *Spicaria violacea* şi pH-ul mediului de cultură. În cazul zincului biosinteza fosfatazei alcaline înregistrează valoarea maximă tot la pH 7 ca şi la probele de control. Avînd în vedere faptul că zincul intră în centrul activ al fosfatazei alcaline [4] şi stabilizează conformaţia moleculei proteice a acesteia [8, 9], se poate considera că la pH-ul 7 se sintetizează acea formă a enzimei care catalitic este cea mai activă.

Cercetările noastre au arătat că biosinteza catalazei și peroxidazei la *Spicaria violacea* depinde într-o mai mică măsură de ionul Zn(II) și practic nu este afectată de Co(II). Cantitatea maximă de cata-

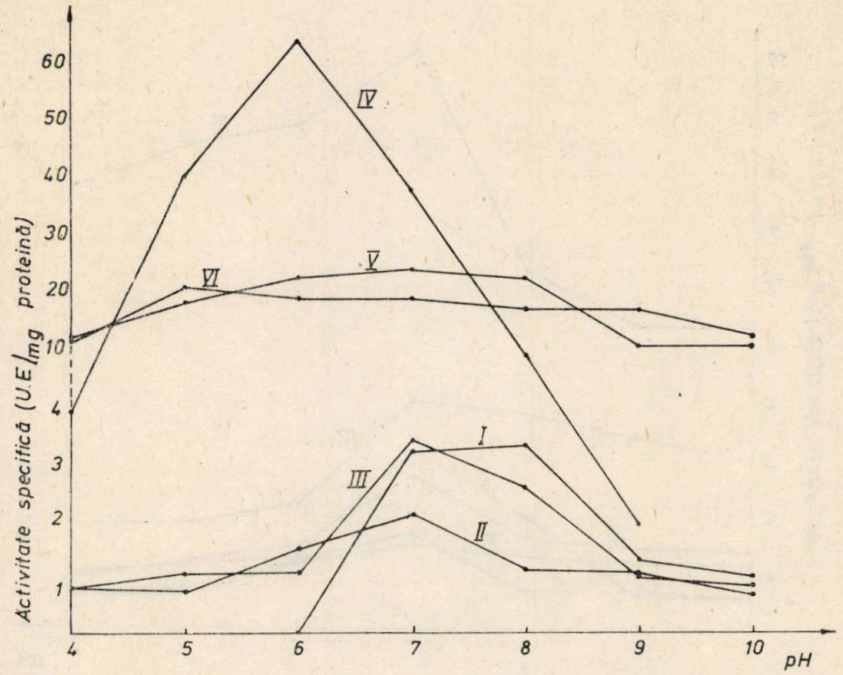


Fig. 1. Influența pH-ului mediului de cultură asupra biosintezei fosfatazei alcaline în celulele de *Spicaria violacea*, în prezența ionilor de Co(II), Zn(II) și Fe(III). I, II, III — martori cu timpul de dezvoltare de 15, 24 și 21 de zile; IV — Co(II): 6,68 μg/ml, timp de dezvoltare 15 zile; V — Zn(II): 5,45 μg/ml, timp de dezvoltare 24 zile; VI — Fe(III): 6,78 μg/ml, timp de dezvoltare 21 zile.

lază în celulele de *Spicaria violacea* se sintetizează la pH 7 atît în probele de control (fig. 2, curbele I, II) cît și în prezența ionilor de Fe(III) și Zn(II) (fig. 2, curbele III, IV).

Viteza de biosinteză a peroxidazei aproape se dublează la pH 7 cînd în mediul de cultură se adaugă ionul Fe(III) (fig. 2, curba VI). După pH 7 se observă o diminuare bruscă a biosintezei peroxidazei, fapt ce poate fi explicat prin slaba toleranță a acestui fung față de mediul alcalin, cunoscut fiind că ciupercile se dezvoltă într-un diapazon de pH cuprins între 3—7 [10].

Influența concentrației ionilor Co(II), Zn(II) și Fe(III) asupra biosintezei fosfatazei alcaline, catalazei și peroxidazei la Spicaria violacea. Acțiunea metalelor asupra enzimelor este un fenomen complex. Unele metale activează o enzimă la o anumită concentrație și inhibă aceeași enzimă la altă concentrație. Deși ionii Co(II), Zn(II) și Fe(III) în concentrațiile indicate mai sus s-au dovedit a fi stimulatori ai biosintezei fosfatazei alcaline, în concentrații mari ei pot deveni inhibitori. Datele obținute

de noi arată că odată cu creşterea concentraţiei ionului adăugat, biosinteza fosfatazei alcaline la *Spicaria violacea* se intensifică, atingînd cele mai ridicate valori pentru 6,68 μg/ml Co(II) 5,45 μg/ml Zn(II) şi 2,71

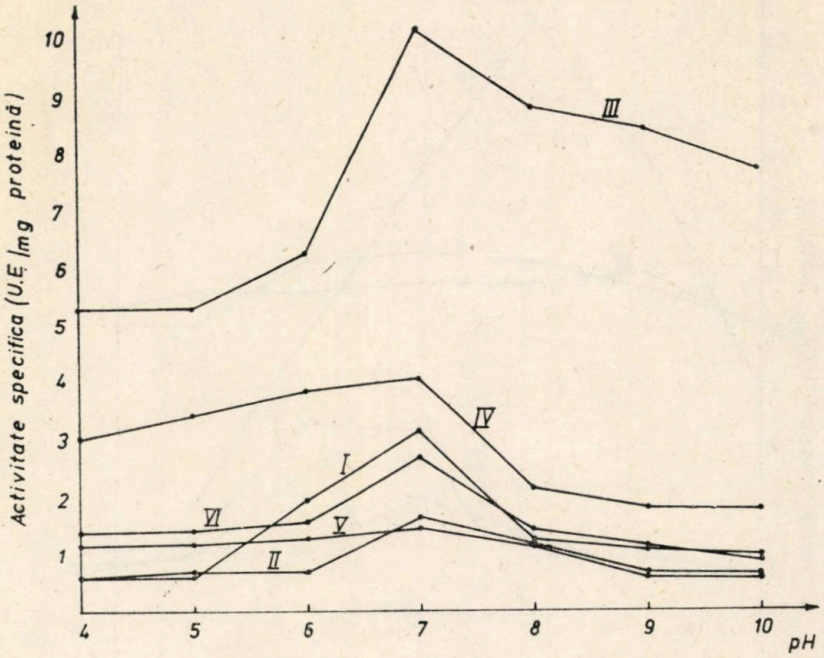


Fig. 2. Influenţa pH-ului mediului de cultură conţinînd ioni de Fe(III) sau Zn(II) asupra biosintezei catalazei şi peroxidazei în celulele de *Spicaria violacea*.
I, II — martori pentru catalază, cu timpul de dezvoltare de 15 şi 24 de zile; III — Fe(III) pentru catalază: 6,78 μg/ml, timp de dezvoltare 15 zile; IV — Zn(II) pentru catalază: 5,45 μg/ml, timp de dezvoltare 24 zile; V — martor pentru peroxidază (timp de dezvoltare 15 zile); VI — Fe (III) pentru peroxidază: 6,78 μg/ml, timp de dezvoltare 15 zile.

μg/ml Fe(III). Dacă ionii respectivi se adaugă în concentraţii mai ridicate decît cele indicate, atunci cantitatea de enzimă formată scade.

Biosinteza catalazei este accelerată de adăugarea Fe(III) în cantitate de 1,35 μg/ml, creşterea ulterioară a concentraţiei lui fiind asociată cu o micşorare a randamentului în enzimă (fig. 3, curba I). În prezenţa ionului de zinc, dinamica biosintezei catalazei se exprimă grafic sub forma unei curbe cu un maxim pentru concentraţia zincului de 3,27 μg/ml (fig. 3, curba II).

Biosinteza peroxidazei atinge valoarea maximă în cazul ionului de fier la concentraţia acestuia de 2,71 μg/ml, iar în prezenţa zincului numai la concentraţii mici de 1,1 μg/ml (fig. 4).

Influenţa timpului asupra biosintezei fosfatazei alcaline la Spicaria violacea în prezenţa ionului de Zn(II). Fiecărui microorganism îi este necesar un anumit timp pentru creştere şi biosinteza enzimelor specifice

lui. Timpul este un factor important în procesul de concentrare a elementelor cu ajutorul ciupercii *Spicaria violacea* [1, 2, 3].

Influența timpului asupra biosintezei fosfatazei alcaline în prezența

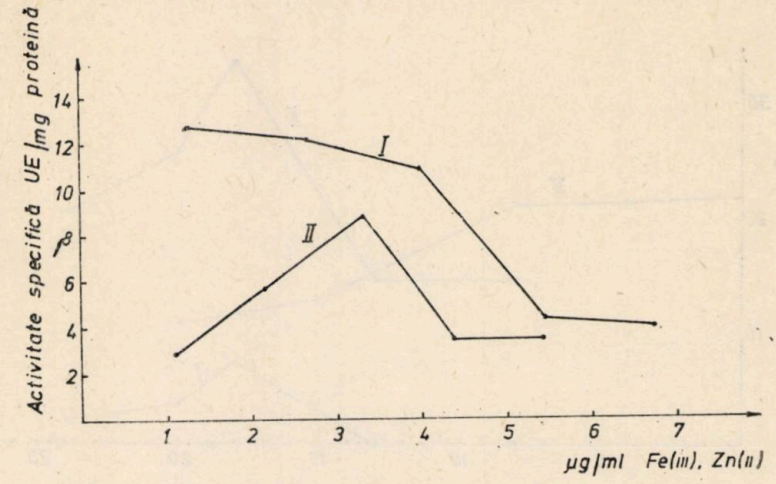


Fig. 3. Influența concentrației ionilor de Fe(III) și Zn(II) asupra biosintezei catalazei în *Spicaria violacea*.
I — Fe(III) : timp de dezvoltare 15 zile, pH = 7 ; II — Zn(II) : timp de dezvoltare 15 zile, pH = 7.

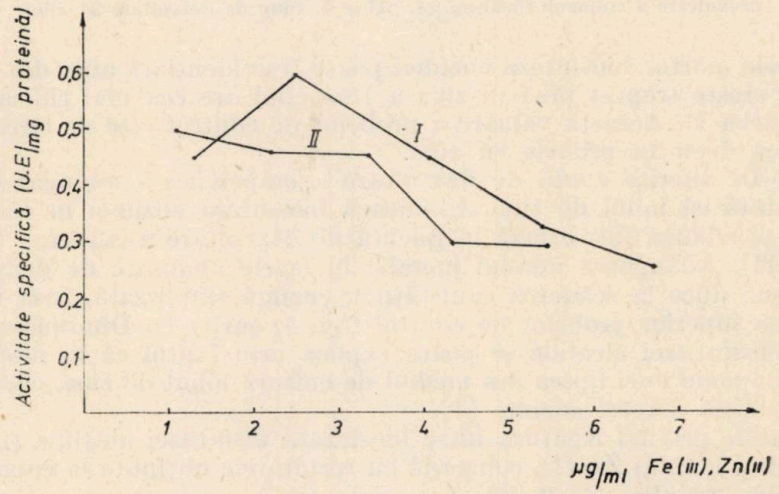


Fig. 4. Influența concentrației ionilor de Fe(III) și Zn(II) asupra biosintezei peroxidazei în *Spicaria violacea*.
I — Fe(III) : timp de dezvoltare 15 zile, pH = 7 ;
II — Zn(II) : timp de dezvoltare 15 zile, pH = 7.

ionului de Zn(II) s-a urmărit în două moduri :

a) Probe inoculate conținînd mediul și o cantitate constantă de Zn(II) (5,45 µg ml) au fost recoltate la diferite intervale de timp de la

începutul dezvoltării ciupercii. Din figura 5 se observă că cantitatea de fosfatază alcalină sintetizată în prezenţa zincului (curba II) creşte în timp atingînd o valoare maximă după 18 zile de dezvoltare a ciupercii.

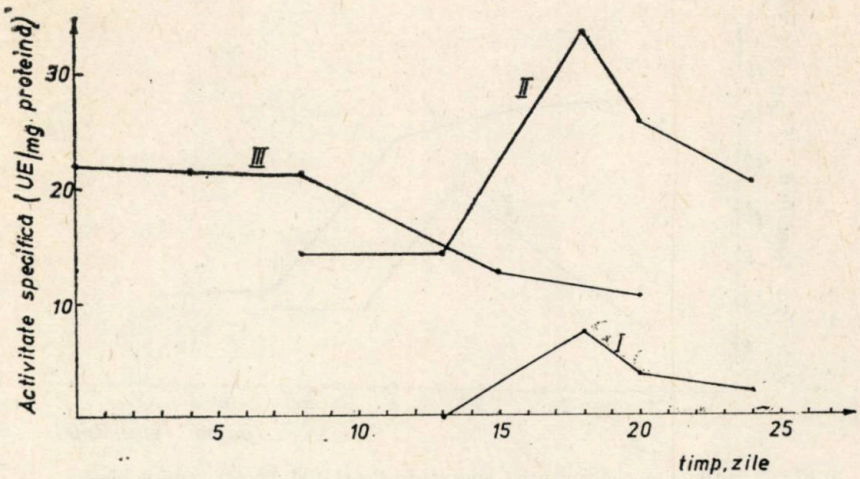


Fig. 5. Influenţa timpului asupra biosintezei fosfatazei alcaline la *Spicaria violacea*, în prezenţa Zn(II).
I — martor (pH=7); II — cultură recoltată la diferite intervale de timp, în prezenţa ionului Zn(II) (5,45 μg/ml, pH = 7); III — adăugarea Zn(II) la diferite etape de dezvoltare a ciupercii (5,45 μg/ml, pH = 7, timp de dezvoltare 24 zile).

În probele martor biosinteza enzimei poate fi evidenţiată abia din a 13-a zi, apoi creşte treptat pînă în ziua a 18-a cînd are cea mai ridicată valoare (curba I). Această valoare a probelor de control este de circa 5 ori mai mică decît în probele cu zinc.

b) În diferite stadii de dezvoltare a ciupercii s-a adăugat Zn(II). Se constată că ionul de zinc stimulează biosinteza enzimei în condiţiile în care se adaugă într-o fază incipientă de dezvoltare a ciupercii (fig. 5, curba III). Adăugarea ionului metalic în fazele avansate de dezvoltare a ciupercii duce la scăderea cantităţii de enzimă sintetizată, însă nivelul ei rămîne superior probelor de control (fig. 5, curba I). Diminuarea biosintezei fosfatazei alcaline se poate explica prin faptul că în momentul formării apoenzimei lipsea din mediul de cultură ionul de zinc, care intră în compoziţia acestei enzime [4].

Datele privind legătura între biosinteza fosfatazei alcaline şi timp, în prezenţa ionului Zn(II), concordă cu rezultatele obţinute la concentrarea ionilor metalici [1, 2, 3].

CONCLUZII

1. Ionii de Co(II), Zn(II) şi Fe(III) exercită o stimulare diferită a biosintezei fosfatazei alcaline, catalazei şi peroxidazei la *Spicaria violacea*, în condiţii determinate de pH, concentraţie şi timp.

2. Întrucît enzimele studiate sînt intracelulare, se poate presupune că are loc incorporarea ionului metalic în biomasa ciupercii și nu o complexare a lui cu anumite substanțe eliberate în lichidul mediului de cultură pe parcursul dezvoltării microorganismului.

3. Rezultatele obținute constituie o dovadă indirectă în susținerea ipotezei conform căreia concentrarea elementelor cu ajutorul ciupercii *Spicaria violacea* se realizează după un mecanism care cuprinde și participarea ionilor metalici la biosinteza metaloenzimelor.

Prezentat la redacție
la 15 august 1977

Universitatea „Al. I. Cuza" Iași,
Laboratorul de biochimie
și
Institutul Politehnic Iași,
Laboratorul de chimie analitică

THE INFLUENCE OF CO (II), FE (III), ZN (II) ON SOME METALLOENZYMES BIOSYNTHESIS IN *SPICARIA VIOLACEA*

SUMMARY

The influence of Co(II), Zn(II), Fe(III) ions on alkaline phosphatase, catalase and peroxidase biosynthesis in *Spicaria violacea* cells has been studied, in different conditions of pH, concentration and time, with the purpose of clearifying the concentration mechanism of some metals by means of this microbiologic collector.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Fișel, V. Dulman, Rev. Chim., **28**, 286 (1977).
2. S. Fișel, V. Dulman, Al. Cecal, J. Radioanal. Chem., **27**, 83 (1975).
3. S. Fișel, V. Dulman, Al. Cecal, J. Radioanal. Chem., **34**, 285 (1976).
4. R. T. Simpson, B. L. Vallee, G. H. Tait, Biochemistry, **7**, 4336 (1968).
5. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*, Ed. Med., București, 1960, p. 400.
6. B. P. Pleskov, *Practikum po biohimii rastenii*, Izd-vo „Kolos", Moskva, 1968, p. 140.
7. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
8. M. J. Schlesinger, K. Barret, J. Biol. Chem., **240**, 42 (1965).
9. R. Robinson, K. M. Soames, Biochem. J., **118**, 740 (1970).
10. H. Ragheb, F. Fabian, Food. Res., **20**, 614 (1955).

ÎNCERCĂRI DE OPTIMIZARE A MEDIULUI DE CULTURĂ PENTRU FUNGUL *A. NIGER*, ÎN VEDEREA OBŢINERII DE ACID CITRIC

LILICA BOTOŞENEANU, CORINA IORDACHE, CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU

Rezumat. S-au încercat diverse tratamente ca : ultrasonarea sporilor, deionizarea melaselor, suplimentarea mediului de cultură pentru *Aspergillus niger* cu diverşi aditivi anorganici şi organici, în vederea creşterii randamentului de producţie a acidului critric. Producţia de acid citric este stimulată de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 mg %, mai puternic în culturile tinere.
O condiţie importantă în producţia optimă de acid citric o constituie omogenizarea mecanică cît mai perfectă. Compoziţia în aminoacizi a melaselor analizate este practic identică.

Îmbunătăţirea randamentului de producţie a acidului citric cu ajutorul fungului *A. niger* este o problemă care preocupă industria alimentară, farmaceutică, chimică etc. avînd implicaţii economice. Dirijarea ştiinţifică a acestui proces prezintă dificultăţi, pe de o parte pentru că bazele lui biochimice nu sînt pe deplin elucidate (1)(2)(3) şi pe de altă parte, pentru că cercetările din acest domeniu au un caracter brevetabil şi deci, informaţiile privind optimizarea mediului de cultură şi a condiţiilor de lucru sînt incomplete.

Determinaţi, în paralel, de motive de ordin economic ca şi de interesul de a elucida unele aspecte teoretice neclare, ne-am propus să creştem randamentul de producţie a acidului citric cu ajutorul fungului *A. niger* prin modificarea condiţiilor de pregătire a mediului de cultură din melase şi mai ales prin suplimentarea lui cu diverşi aditivi. Pe baza unor informaţii bibliografice, în primul caz ne-au preocupat, omogenizarea melaselor şi acidifierea lor (4, 5, 6, 7, 8) precum şi ultrasonarea sporilor (9) iar în al doilea caz, suplimentarea mediilor de cultură cu săruri de cupru (10), de zinc şi potasiu (11), uree (8), tween 80 (12, 13), metanol (14, 15, 16, 17) şi deionizarea melaselor (5).

MATERIAL ŞI METODE

Melasele folosite pentru pregătirea mediilor de cultură, obţinute de la I.I.S. — Zahăr, Giurgiu, prezentau următoarele caracteristici : melasa 1 : pH 7,53 ; substanţă uscată ; 77,6°Bx ; zahăr (polarimetric) : 49,2% : melasa 2 : pH 7,61 ; substanţă uscată : 76,6° Bx ; zahăr (polarimetric) : 47,2%.

Analiza calitativă a aminoacizilor s-a făcut prin cromatografie pe hîrtie (18). Mediul de cultură preparat din melasă, a avut în final o concentraţie de 175‰ zahăr, un pH de 6,8—6,9 corectat cu H_2SO_4 1 : 10 sau cu H_3PO_4 4% la care s-a adăugat $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$ 5‰ şi H_3PO_4 0,6 ‰ (faţă de zahăr) la 80°C. Amestecul a fost încălzit 5 min la 100°C. Toate operaţiile s-au efectuat sub agitare continuă. Final, amestecul s-a diluat cu apă (la martori) sau cu soluţii de aditivi, sterilizate (cîte 10 ml la 40 ml amestec).

Deionizarea melaselor s-a realizat prin trecerea acestora, după diluare și acidifiere cu H_2SO_4 1 : 10 (pH 4,0) pe coloane de zerolit 225 SRC—10 (0,9 × 18 cm). Eluatul s-a diluat la concentrație finală de 175‰ zaharoză.

Ultrasonarea sporilor s-a efectuat cu 20 Kc/s timp de 4 min 10 s, la un aparat de ultrasunete MSE, după De și Srivastava (9).

Însămînțarea culturilor s-a făcut cu 1 ml suspensie spori.

Incubarea probelor, în culturi de suprafață, s-a făcut la 30°, într-un incubator Gallenkamp.

S-au recoltat probe la 3, 5, 7, 9 și 12 zile de incubare, prin filtrarea și centrifugarea la 4000 rpm a mediilor de cultură.

pH-ul mediilor de cultură s-a determinat la un pH-metru MV 87 Digital.

Aciditatea mediilor de cultură s-a titrat cu NaOH 0,25N pînă la pH 7,0, după indicațiile lui Dhankhal și col. (14).

Acidul citric acumulat în mediile de cultură s-a dozat gravimetric, prin precipitare cu $Ca(OH)_2$ pînă la pH 7,6.

Greutatea umedă a miceliilor s-a determinat după spălarea abundentă cu apă și uscare prin presare cu hîrtie de filtru.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Examinînd datele înscrise în tabela 1 privind pH-ul și aciditatea lichidului de cultură a fungului *Aspergillus niger* (fig. 1) se observă că pentru probele martor cu melasa 1 ca substrat, pH-ul și aciditatea diferă în cele trei serii de experiențe. În decurs de 12 zile de creștere, la seria I pH-ul scade de la 6,66 la 4,65, în timp ce la seria a II-a și a III-a pH-ul scade de la 5,33 la 2,87 respectiv de la 5,27 la 3,08.

Tabela 1

pH-ul mediului de cultură pentru *Aspergillus niger* în primele 12 zile de creștere (seria I)

Nr. crt.	Tratament	3 zile	5 zile	7 zile	9 zile	12 zile
	MELASA 1					
1.	Martor	6,66	5,96	4,61	5,00	4,65
2.	Spori ultrasonați	6,84	6,04	4,86	4,79	4,48
3.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4 mg%	6,53	5,56	4,98	4,40	3,70
4.	Uree, 1mg/ml	6,45	5,37	4,70	4,54	4,55
5.	$ZnSO_4 7H_2O$ 3mg‰ + + KH_2PO_4 96 mg‰	6,66	5,07	4,52	4,56	4,64
6.	Metanol 4%	6,93	6,86	6,70	6,80	6,67
7.	Tween 80, 0,1%	6,91	6,38	5,52	4,78	4,26
	MELASA 2					
1.	Martor	5,86	3,86	3,52	3,34	2,96
2.	Spori ultrasonați	5,58	4,45	3,88	3,32	3,36
3.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4 mg%	5,72	4,10	3,59	3,51	3,05
4.	Uree, 1 mg/ml	5,91	4,36	3,64	3,32	2,94
5.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg‰ + + KH_2PO_4 96 mg‰	5,83	4,22	3,67	3,62	3,14
6.	Metanol 4%	7,20	7,08	6,86	6,82	6,61
7.	Tween 80, 0,1%	6,90	5,60	4,76	3,92	3,47

Diferitele tratamente aplicate, fie prin ultrasonarea sporilor, fie prin adăugarea în lichidul de cultură a unor substanțe implicate, direct sau indirect, în creșterea fungului și în procesul de acumulare a acidului citric, nu au dus la modificări de pH diferite față de cele obținute pentru

probele martor. Excepție o constituie proba tratată cu $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 4 mg% care, la 12 zile, duce la o scădere a pH-ului de la 6,53 inițial la 3,70 final. Această acțiune a Cu^{2+} asupra valorilor pH-ului și a aciditătii lichidului de cultură nu poate fi asociată cu favorizarea producției de biomasă. Într-adevăr, deși pH-ul scade, biomasa este redusă în comparație cu martorul, după cum se observă din examinarea valorilor redate în tabela 2.

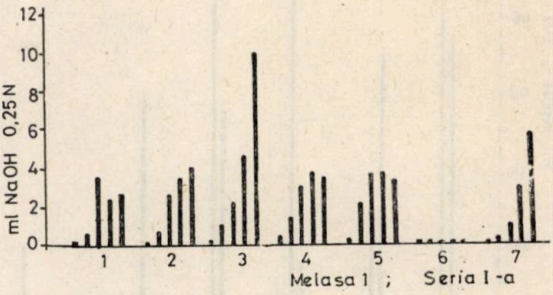


Fig. 1. Aciditatea mediilor de cultură, exprimată în ml NaOH 0,25 N, în primele 12 zile de creștere. (Cifrele au semnificația corespunzătoare din tabela 1, pentru melasa 1, seria I; pentru fiecare tratament s-a determinat aciditatea la 3, 5, 7, 9 și 12 zile).

Tabela 2

Greutatea umedă a micheliului de *A. niger* în primele 12 zile de creștere (gr)

Nr. crt.	Tratament	3 zile	5 zile	7 zile	9 zile	12 zile
	Seria I-a MELASA 1					
1.	Martor	0,110	0,225	4,270	0,295	7,870
2.	Spori ultrasonați	0,100	0,315	2,630	8,735	8,165
3.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 mg%	—	0,535	2,195	5,445	5,315
4.	Uree, 1mg/ml	0,135	0,600	6,830	8,600	7,295
5.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg‰ + + KH_2PO_4 96 mg‰	0,108	1,350	5,025	6,835	6,390
6.	Metanol 4%	—	—	—	—	—
7.	Tween 80 0,1%	—	0,085	1,355	2,600	5,810
	Seria I-a MELASA 2					
1.	Martor	0,260	2,225	4,800	7,070	6,840
2.	Spori ultrasonați	0,275	1,155	3,375	6,910	5,255
3.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	0,205	1,925	4,305	5,100	4,960
4.	Uree 1 mg/ml	0,174	1,415	4,425	6,835	6,690
5.	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 3 mg‰ + + KH_2PO_4 96 mg‰	0,224	2,415	4,940	6,540	7,960
6.	Metanol 4%	—	—	—	—	—
7.	Tween 80 0,1%	0,100	0,205	1,600	3,740	5,075
	Seria II-a MELASA 1					
1.	Martor	0,195	0,890	3,820	4,390	7,635
3.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	0,690	3,015	3,600	3,355	5,755
13.	Melasă deionizată	0,050	0,945	3,915	8,560	11,880
	Seria II-a MELASA 2					
1.	Martor	0,080	0,830	2,730	3,975	6,000
2.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	0,485	2,360	3,665	3,005	4,955
13.	Melasa deionizată	0,745	3,945	10,610	12,220	10,550
15.	Raulin modificat	2,020	3,505	4,045	5,795	6,825

Rezultatele obținute în seria I dar cu melasa 2 arată, de asemenea, că cele mai multe dintre tratamentele aplicate nu au efect (tabela 1, fig. 2).

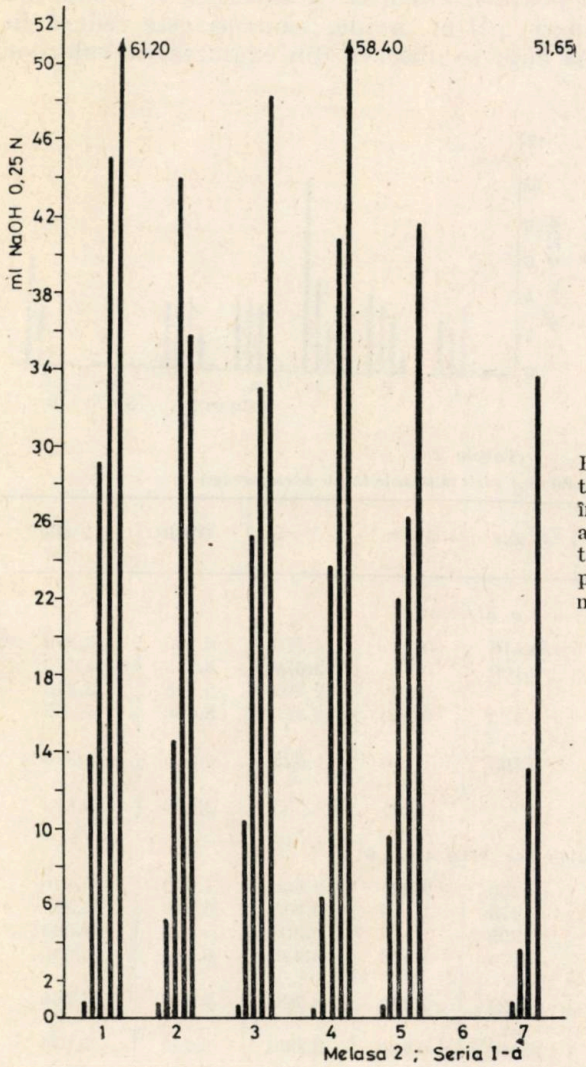


Fig. 2. Aciditatea mediilor de cultură, exprimate în ml NaOH 0,25N, în primele 12 zile de creștere. (Cifrele au semnificația corespunzătoare din tabela 1, pentru melasa 2, seria I; pentru fiecare tratament s-a determinat aciditatea la 3, 5, 7, 9 și 12 zile).

Avînd în vedere rezultatele obținute în prima serie de experiențe, am procedat la o verificare a acțiunii ionilor de Cu^{2+}. În seria a II-a de experiențe am utilizat pentru pregătirea mediilor de cultură și melase deionizate, pe baza informațiilor bibliografice care atestă efectul pozitiv al acestei prelucrări asupra producției de acid citric (5, 19). Pentru verificarea efectului tratamentelor aplicate am utilizat și un mediu de cultură sintetic — mediul Raulin — căruia i s-a adăugat zaharoză și i s-a corectat pH-ul pînă la valoarea 6,8.

În această serie de experienţe, martorul atît pentru melasa 1 cît şi pentru melasa 2 s-a comportat practic identic, în ceea ce priveşte scăderea pH-ului în primele 12 zile ale creşterii, evoluţia biomasei şi a acidităţii (tabela 3, fig. 3).

Tabela 3

pH-ul mediului de cultură pentru *Aspergillus niger* în primele 12 zile de creştere (seria II.a)

Nr. crt.	Tratament	3 zile	5 zile	7 zile	9 zile	12 zile
		MELASA 1				
1.	Martor	5,33	4,34	3,69	3,46	2,87
2.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	4,33	3,72	3,84	3,52	2,82
13.	Melasă deionizată	5,73	4,70	4,16	3,42	4,03
		MELASA 2				
1.	Martor	5,52	4,56	3,88	3,45	3,00
2.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	4,52	3,80	3,54	3,30	2,85
13.	Melasă deionizată	4,65	3,95	3,60	4,42	4,80
15.	Raulin modificat	2,56	2,08	2,06	1,88	1,93

Dacă luăm în consideraţie comportarea diferită a melaselor 1 şi 2 în privinţa indicilor analizaţi, în prima şi în a doua serie de experienţe, singura explicaţie plauzibilă ar putea fi prelucrarea iniţială a melaselor. Se pare că omogenizarea are un rol destul de mare în buna desfăşurare a procesului de producţie a acidului citric dar influenţează doar parţial dezvoltarea miceliului. O omogenizare corectă asigură mobilizarea din depozitul solid al melasei şi trecerea în stare de suspensie a unor factori esenţiali pentru sinteza acidului citric, dar nu şi pentru creşterea miceliului.

Se constată din examinarea tabelei 3 că efectul ionilor de Cu^{2+} de scădere a pH-ului şi creşterea acidităţii se menţine.

Deionizarea melaselor, în modul efectuat de noi, a dus la rezultate negative, inhibînd producerea acidităţii. Numai în cazul melasei 2 am obţinut o activare a procesului în primele 5 zile ale culturii de *A. niger*, după care a urmat o inhibiţie puternică. Aceste observaţii sînt cu atît mai interesante cu cît melasele astfel deionizate se dovedesc a fi mult mai bine utilizate de fungul *A. niger* pentru producţia de biomasă decît melasele standard (tabela 2).

Din analiza comportării mediului de cultură Raulin sintetic apare faptul că suşa de *A. niger* folosită în experienţele noastre scade rapid (chiar în primele 3 zile) pH-ul mediului de la 6,8 la 2,6. Totuşi, această acidifiere nu corespunde în întregime acumulării probabile de acid citric dacă luăm în consideraţie aciditatea deosebit de redusă exprimată în ml NaOH 0,25 N necesar pentru neutralizare (fig. 3).

În afara celor arătate mai sus trebuie consemnat faptul că un parametru important în pregătirea mediilor de cultură a fost acidifierea melaselor 1 şi 2 la pH 2,8, atît cu H_2SO_4 cît şi cu H_3PO_4. Tulpina de *A. niger* folosită de noi nu se dezvoltă la un pH ~ 3, valoare de pH recomandată de diverşi autori pentru o bună producţie de acid citric. Acest fapt se poate datora — în parte — fenomenelor asociate acidifierii (precipitări, coprecipitări), după cum au semnalat şi alţi autori (6, 7, 8).

Pentru evidenţierea concluziilor obţinute în cadrul celor două serii de experienţe, am efectuat cîteva dozări gravimetrice de acid citric sub formă de citrat de calciu. După cum se observă din datele expuse în

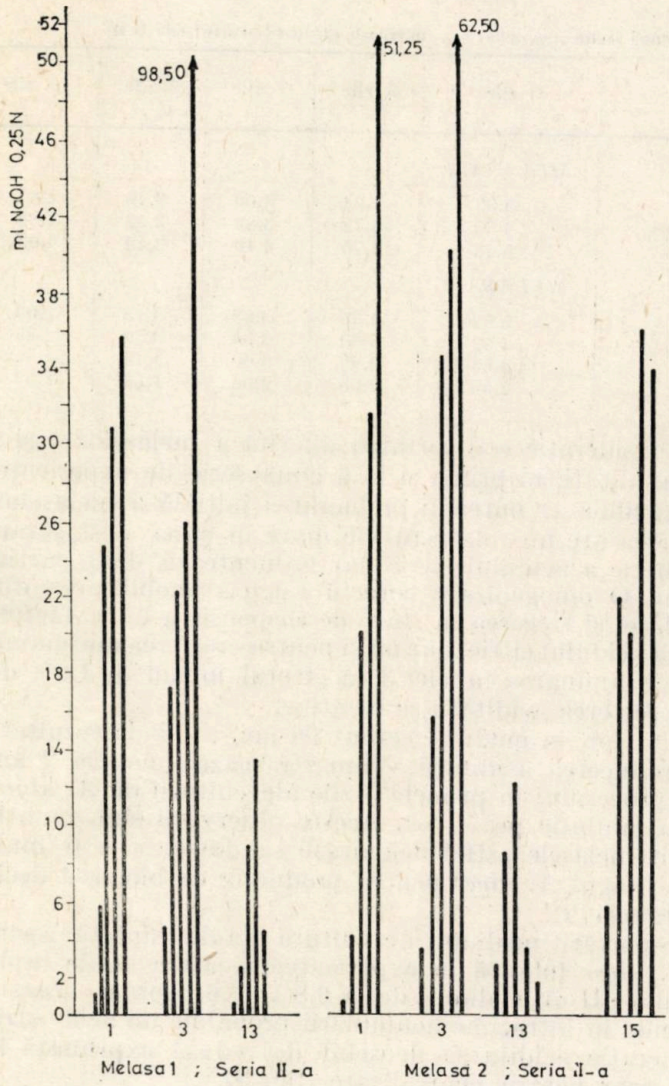


Fig. 3. Aciditatea mediilor de cultură, exprimată în ml NaOH 0,25N, în primele 12 zile de creştere. (Cifrele au semnificaţia corespunzătoare din tabela 3, pentru melasa 1 şi 2, seria a II-a ; pentru fiecare tratament s-a determinat aciditatea la 3, 5, 7, 9 şi 12 zile).

tabela 4, observaţiile noastre anterioare s-au confirmat. Dozările gravimetrice în proba cu $CuSO_4$ arată o creştere de aproximativ 50% a acidului citric, deşi titrimetric această creştere era de aproape 200%. Această discordanţă dintre datele gravimetrice şi cele titrimetrice poate fi explicată prin faptul că aciditatea titrată se datoreşte doar în parte acidului citric, restul fiind reprezentat de alţi acizi organici.

Este de menţionat încă o constatare interesantă. Se ştie că în industria acidului citric mediul de cultură se colectează în cea de-a 9-a zi de creştere a miceliului. Ori, din datele obţinute de noi în cursul a 12 zile de creştere, se constată că procesul de acumulare a acidului citric continuă mult după încheierea fazei de sporulare a miceliului de *A. niger*, cu randamente superioare celor obţinute la 9 zile (tabela 4).

Tabela 4

Acidul citric din mediul de cultură pentru *Aspergillus niger* în primele 12 zile de creştere (mg citrat de calciu/10 ml mediu de cultură) — Seria II-a

Nr. crt.	Tratament	3 zile	5 zile	7 zile	9 zile	12 zile
		MELASA 1				
1.	Martor	—	—	—	412,4	649,5
2.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 4 mg%	—	—	—	—	926,5
		MELASA 2				
1.	Martor	—	—	—	220,6	—
2.	Raulin modificat	—	220,0	—	513,6	—

În afara determinărilor privind unii parametri fizico-chimici ai melaselor, a experienţelor privind suplimentarea melaselor cu aditivi minerali şi organici şi a pregătirii mediilor de cultură (omogenizarea melaselor, acidifierea şi ultrasonarea sporilor), s-a analizat calitativ compoziţia melaselor în aminoacizi. Se ştie (20) că unii aminoacizi (treonina, alanina şi mai ales lizina) sînt favorabili acumulării de acid citric, pe cînd valina are un efect mult mai slab. Examinînd compoziţia în aminoacizi liberi a melaselor 1 şi 2 se constată identitatea celor două melase cel puţin în privinţa celor 17 aminoacizi care s-au identificat faţă de etaloane. Faţă de cele menţionate în literatură (20) cele două melase analizate nu par a fi bogate în treonină, alanină şi lizină. În schimb, se evidenţiază serina, glicocolul şi acidul aspartic, metionina, valina, fenilalanina.

CONCLUZII

1. Diverse tratamente ca ultrasonarea sporilor, deionizarea melaselor, suplimentarea cu diverşi aditivi anorganici şi organici nu duc la creşteri apreciabile ale producţiei de acid citric. Dezvoltarea tulpinii folosite de noi a fost chiar inhibată total (metanol 4%) sau parţial (Tween 80, 0,1%).

2. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 mg% stimulează producţia de acid citric, mai puternic în culturile tinere şi mult mai slab sau deloc în culturile avansate.

3. Omogenizarea mecanică cît mai perfectă a melaselor în vederea pregătirii mediilor de cultură este o condiţie importantă în producţia optimă de acid citric.

4. Procesul de acumulare a acidului citric continuă după încheierea fazei de sporulare a miceliului de *A. niger*, cu randamente superioare.

5. Compoziţia calitativă în aminoacizi a celor două melase este practic identică.

Prezentat la redacţie la 5 decembrie 1977

Institutul de Ştiinţe Biologice-Bucureşti

ATTEMPTS FOR OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR CITRIC ACID PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER*

SUMMARY

Various treatments as spores ultrasonication, molasses deionization, supplementation of culture medium of *A. niger* with various organic and inorganic additives, were tested for their effects on the increase of citric acid yield. Citric acid production is stimulated by $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4 mg% particularly in young cultures. A mechanical homogenization as good as possible is an important condition for an optimal citric acid production. The aminoacid composition in the two molasses tested is practically identical.

BIBLIOGRAFIE

1. S. C. Prescott, C. G. Dunn, *Industrial microbiology*, Mc Graw-Hill, New York, London, Toronto, 1959.
2. D. Perlmann, C. J. Sin, Progress ind. Microbiol., **2**, 169 (1960).
3. J. Meyrath, Proc. Biochem., **2**, 25 (1967).
4. L. B. Lockwood, L. B. Schweiger, *Citric and itazonic acid fermentation*, Microbiol. Technol. editor H. J. PEPPLER; Reinhold Publ. Corp., 1967, p. 183.
5. J. E. Smith, A. Nowakowska-Waszczuk, J. G. Anderson, *Organic Acid Production by Mycelian Fungi*, Industrial aspects of Biochemistry, editor B. SPENCER, North Holand, 1974, p. 297.
6. E. I. Gorbataia, V. A. Smirnov, Priclad. biochim. microbiol., **IX**, 375 (1973).
7. N. I. Derkanosov, *Teză de doctorat* (l. rusă), Kiev, 1972.
8. J. Leopold, in *Materialele conferinței științifico-tehnice privind intensificarea proceselor de producere a acizilor din industria alimentară*, Riga, 1961.
9. S. K. De, A. S. Srivastava, Sci. Cult., **41**, 459 (1975).
10. B. J. Macris, Biotechnol. Bioeng., **17**, 1373 (1975).
11. V. M. Golubtsova, Khlebopek. Konditer. Prom., **2**, 26 (1974).
12. N. F. Millis, B. Trumph, B. M. Palmer, Jour. Gen. Microbiol., **30**, 365 (1963).
13. W. Gold, R. J. Kieber, Patent USA 3.372.094 (1968).
14. H. S. Dhakhar, S. Ethiraj, S. R. Vyas, Indian J. Technol., **12**, 316 (1974).
15. J. Szczodrak, Z. Ilczuk, Przem. Ferment. Rolny, **19**, 20 (1975).
16. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., **1**, 1 (1953).
17. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., **1**, 8 (1953).
18. V. V. Dorokhov, S. A. Konovalov, Priclad. biochim. microbiol., **V**, *3*, 265 (1969).
19. P. Nandi, A. K. Mishra, *New processes for citric acid production from deionized cane molasses and refined cane sugar*, in Fermentation Technology Today, 4 th, 209, 13 (1972).
20. A. S. Srivastava, S. P. Tandon, Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. A *43*, 251 (1973).

ACŢIUNEA DIAZINONULUI ASUPRA FORMĂRII ŞI DEZVOLTĂRII EMBRIONILOR DE *GALLUS DOMESTICUS*

SIMONA CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU, ADELA ŞTEFAN, ELENA IONIŢĂ

Rezumat. Tratamentul cu diazinon la concentraţii diferite (20%, 10%, 5%, 2,5% şi 1%) a ouălor de găină, înainte de incubare prin ţinerea lor în contact cu soluţia 30 de secunde a produs :

a) moartea embrionilor în diverse stadii de dezvoltare (în funcţie de concentraţia soluţiei) probabil prin inhibarea de către toxic a unor enzime necesare dezvoltării normale a acestora ;

b) la puii eclozionaţi prezenţa simptomelor de inapetenţă, piuit nervos şi apatie, ceea ce denotă că diazinonul a inhibat acetilcolinesteraza necesară în funcţionarea normală a sistemului nervos.

S-a constatat de asemenea prezenţa malformaţiilor la numeroşi embrioni şi la puii eclozionaţi.

Diazinonul este un insecticid organofosforic ce se foloseşte în zootehnie pentru combaterea actoparaziţilor, precum şi în agricultură pentru combaterea diferiţilor dăunători (insecte şi larvele lor). Se administrează sub formă de soluţie, în concentraţie de 0,01 — 0,08% şi în doză de 0,275 — 0,550 kg/ha, substanţă activată (11). Hidrolizează uşor în soluţie apoasă ; absorbit de rădăcinile plantelor ajunge repede în frunze şi fructe şi devine toxic pentru consumatorii acestora. Toxicitatea lui, pentru mamifere, este relativ redusă deşi este un inhibitor al colinesterazei mai activ decît parationul. Acumularea substanţei în corpul animalelor, păsărilor şi omului ar putea produce însă intoxicaţii cronice, asemănătoare celor produse de insecticidele organoclorurate.

Dacă prezenţa şi acumularea insecticidelor organoclorurate, în multe ţesuturi vii şi produse de origine animală, este semnalată de mulţi cercetători West şi Milby, (1965), Terriere şi col. (1959), Findlay şi Hamilton (1968) citaţi de (16), (8), (4), (9), (10), acumularea pesticidelor organofosforice în ouă şi efectul lor asupra dezvoltării embrionilor la păsări nu este semnalată în literatura de specialitate. Ţinînd seama de aceasta, în lucrarea de faţă ne-am propus să cercetăm acţiunea diazinonului asupra formării şi dezvoltării embrionilor de *Gallus domesticus*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările au fost efectuate pe un număr de 350 de ouă de găină din rasa *Rhode-Islande*, obţinută de la ferma experimentală Băneasa a Institutului Agronomic „N. Bălcescu" din Bucureşti. Înainte de începerea experienţei, ouăle au fost controlate şi găsite fecunde. Au fost apoi împărţite în 7 loturi a 50 de bucăţi fiecare şi tratate cu diazinon dizolvat în acetonă, prin cufundare în soluţie şi ţinute în contact cu aceasta 30 de secunde. Au fost folosite soluţii

cu următoarele concentrații de diazinon: 20% (lot I), 10% (lot II), 5% (lot III), 2,5% (lot IV), 1% (lot V), acetonă pură (lot VI), lotul VII fiind alcătuit din ouă netratate (martor). După tratament, ouăle au fost introduse în incubator și controlate cu ovoscopul periodic pînă la eclozionare, urmărindu-se formarea și dezvoltarea embrionilor.

La un număr de 35 embrioni (cîte 5 din fiecare lot) s-au făcut observații și asupra cromozomilor din splină. Punerea în evidență a cromozomilor s-a făcut după metoda lui Jaffe și Fechheimer (6).

REZULTATE

Numărul embrionilor morți și al celor viabili, găsiți la controlul periodic, precum și al celor eclozionați, este redat în tabela 1.

Se constată că cel mai ridicat procent de mortalitate a embrionilor s-a înregistrat la ouăle tratate cu diazinon în concentrație de 20%, 10%,

Tabela 1

Mortalitatea embrionilor de găină sub acțiunea diazinonului (concentrații diferite)

Lot	Concentrația soluției de diazinon	Nr. ouă	Controlul periodic al embrionilor							Eclozionați		Procent mortalitate
			La 7 zile			La 17 zile		La 21 zile		Normali (viabili)	Cu malformații și viabilitate scăzută	
			Limpezi	vii	morți	vii	morți	vii	morți			
I	20%	50	—	38	12	26	12	—	50	—	—	100%
II	10%	50	5	40	5	33	7	3	37	—	—	100%
III	5%	50	4	46	—	35	11	12	23	—	—	100%
IV	2,5%	50	1	49	—	29	20	20	29	—	13	70%
V	1%	50	4	46	—	25	21	25	—	5	20	50%
VI	acetonă	50	7	43	—	43	—	40	3	40	—	6%
VII	netratați	50	—	—	—	—	—	—	—	50	—	—

5%. Embrionii care au reușit să se formeze în ouăle tratate cu soluția de diazinon 20% prezentau deformări ale corpului și în special ale capului. Efect asemănător s-a obținut și în cazul tratării ouălor cu diazinon 10% (fig. 1). La unii din embrionii acestui lot s-a mai constatat și edem al cefei. O disproporționalitate a părților corpului, mai puțin accentuată, a fost observată la embrionii dezvoltați în ouăle tratate cu soluție de diazinon 5%; dar și la acești embrioni s-a întîlnit edem al cefei. Mulți dintre ei prezentau malformații la degetela picioarelor (fig. 2). Menționăm că din acest lot nu a reușit să eclozioneze nici un pui. Dintre embrionii formați în ouăle tratate cu diazinon sol. 2,5% au reușit să eclozioneze 13 din 50, adică 26%, dar toți au prezentat malformații, aveau picioarele strîmbe și nu reușeau să-și sprijine corpul pe ele. Supraviețuirea lor nu a durat mai mult de 48 de ore. La o concentrație mai mică de diazinon (1% au murit numai 1/2 din embrionii formați, dar 70% din cei eclozionați prezentau deformări ale oaselor de la picioare și o stare de apatie accentuată (vizibilatate scăzută) (fig. 3A) și numai 30% s-au dezvoltat normal. O ușoară apatie s-a observat și la unii pui proveniți din ouă tratate cu acetonă. În fig. 3 B este prezentată fotografia unui pui normal, provenit din ouă netratate.

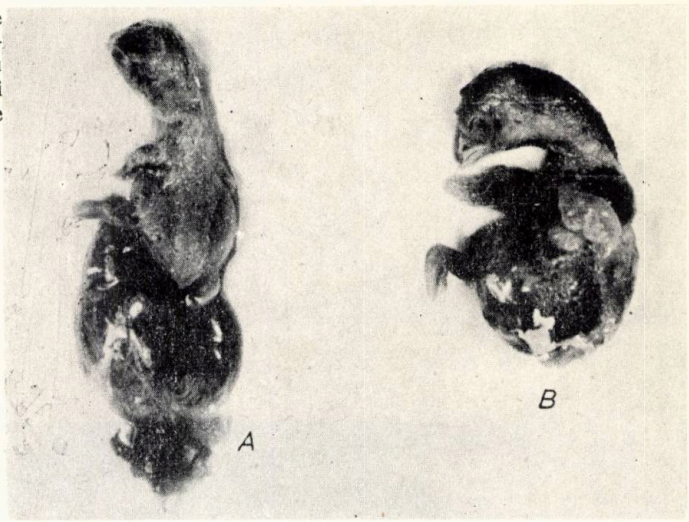


Fig. 1 — Embrionii de *Gallus domesticus* — proveniţi din ouă tratate cu sol. diazinon 20% A şi 10% B în acetonă-înainte de ecluzionare.

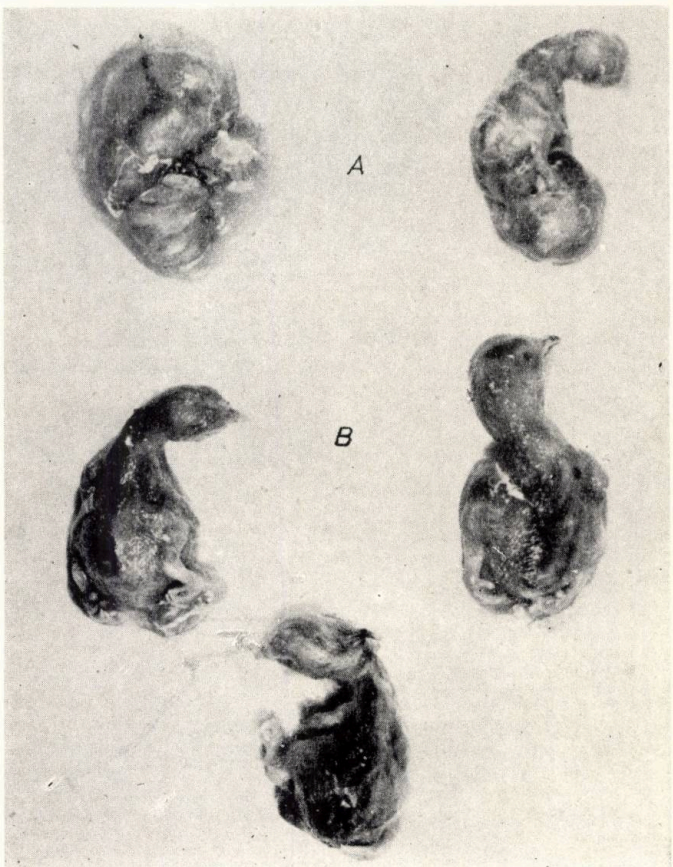


Fig. 2 — Embrioni de *Gallus domesticus* — proveniţi din ouă tratate cu sol. diazinon 5%A şi 2,5% B în acetonă — înainte de ecluzionare.

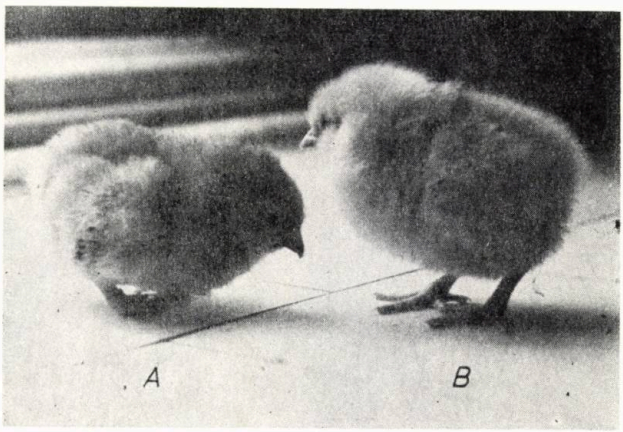


Fig. 3 — Pui de *Gallus domesticus* — proveniţi din ouă tratate cu sol. diazinon 1% A în acetonă — înainte de eclozionare — şi B pui martor (netratat).

Ca simptome, la puii eclozionați din ouă tratate s-a observat inapetență, piuit nervos, excitabilitate excesivă, scăderea în greutate și apoi survenirea morții. O bună parte din aceste manifestări s-ar putea datora inhibării competitiv și ireversibil a acetilcolinesterazei de către substanța toxică, ceea ce duce la blocarea transmiterii influxului nervos. Manifestări asemănătoare au mai fost observate de noi, tratînd șobolani cu TMTD (12), vitavax (13) și dimethoat (14).

Oprirea în dezvoltare a embrionilor și survenirea morții acestora, înainte de eclozionare, s-ar putea datora blocării, în afară de acetilcolinesterază și a altor enzime (glucozo-6-fosfodehidrogenazei, succinatdehidrogenază, citocromoxidază, glutamatdehidrogenază etc.) (2), (5), (7), (15).

Se știe că, organismele în formare sau tinere se intoxică mai ușor decît cele dezvoltate. Sistemele enzimatice microsomale, formate deja la animalele dezvoltate, pot să reducă parțial din acțiunea toxică a insecticidului. Stimularea metabolismului microsomal cu diferite medicamente, cum ar fi fenobarbitalul (50 mg/kg zilnic), mărește viteza de eliminare a toxicului (1), (3).

Studiul cromozomilor, la embrionii dezvoltați în ouăle tratate, nu a arătat modificări esențiale. Ar fi fost posibil ca la o observație directă, alterări moderate ale cromozomilor, să fi scăpat atenției. Comparînd însă cariotipul unui embrion asupra căruia a acționat diazinonul, cu cariotipul celui normal am constatat totuși că la cariotipul provenit de la indivizii tratați procentul de rupturi a cromozomilor este mai mare decît la martor. Considerăm că studiul cromozomilor, efectuat de noi, rămîne un punct de plecare pentru cercetări viitoare în acest domeniu.

CONCLUZII

1. Tratarea cu diazinon 20%, 10% și 5% dizolvat în acetonă, a ouălor de găină, a produs moartea tuturor embrionilor în diferitele lor stadii de dezvoltare. Numeroși embrioni deveniseră monștri.

2. Puii eclozionați din ouă tratate cu diazinon 2,5% au prezentat malformații și nu au supraviețuit mai mult de 48 de ore.

3. La concentrația de 1% diazinon, au eclozionat 50% din embrioni, dar 70% din aceștia au prezentat malformații și numai 30% s-au dezvoltat normal.

4. O ușoară apatie s-a observat și la puii eclozionați din ouă tratate numai cu acetonă.

5. Oprirea formării și dezvoltării embrionilor, s-ar putea datora inhibării de către toxid, a activității unor enzime cu rol important în metabolism și desfășurarea unor funcții vitale (acetilcolinesterază, glucozo-6-fosfodehidrogenază, citocromoxidază etc.).

6. În toate cazurile cercetate cromozomii din splină prezentau un procent ridicat de rupturi.

Prezentat la redacție
la 20 decembrie 1976

FACULTATEA DE BIOLOGIE
Laboratorul de Biochimie
București 34, Splaiul Independenței 101 și
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
Laboratorul de Fiziologie animală
București 34, Splaiul Independenței 105

ACTION DU DIAZINON SUR LA FORMATION ET LE DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS DE *GALLUS DOMESTICUS*

RÉSUMÉ

Le traitement à solutions de concentrations différentes de diazinon des œufs de *Gallus domesticus*, 30 secondes avant l'incubation indique :

a) quelques embryons sont morts avant l'éclosion probablement à cause de l'inhibition des enzimes nécessaires pour le développement normal des embryons ;

b) les poulets éclos présentent des symtomes d'inappétence, manifestent une nervosité excessive, qui dénote que le traitement à diazinon mène probablement à l'inhibition de la transmission de l'influx nerveux ; les embryons non éclos et les embryons éclos des œufs maintenus en diverses dilutions ont présenté des malformations.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Cueto Jr, V. Hayes Jr. Toxic Appl. Pharmac., **7**, 481 (1965).
2. T. Dombrovski, S. Zavistovski, T. Minter, I. Gavovska, M. Tirakovski, Rev. Igiena, **15**, 59 (1966).
3. K. Du Bois, P. Florance, K. Kinoshita, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **129**, 3, 699 (1968).
4. W. G. Eden, Y. Econ. Ent., **44**, 1 013 (1951).
5. L. G. Hart, R. W. Shultice, J. R. Fouts, Toxic. Appl. Pharmac., **5**, 371 (1963).
6. W. P. Jaffe, N. S. Fechheimer, Proc. 13 – th Wild's Poult. Cong. Kiev. Sect. Pop, 31 (1966).
7. N. V. Jdonovici, I. F. Udalov, Rev. Igiena, **19**, 43 (1970).
8. R. Meiniel, Y. Lutz-Ostertag, Arch. Anat. Micr. Morph. Exp., **60**, 235 (1971).
9. M. M. Rosemberg, H. E. Adder, Am. J. Vet. Res., **11**, 142 (1950).
10. M. M. Rosemberg, T. Tanaka, Am. J. Vet. Res., **11**, 233 (1950).
11. Adela Ştefan, *Biochimia insecticidelor şi fungicidelor*. Centrul de multiplicare al Universităţii Bucureşti, 86 (1972).
12. Adela Ştefan, Simona Ceauşescu, N. Stăncioiu, St. cerc. Biol., Zool., **24**, 5, 443 (1972).
13. Adela Ştefan, N. Stăncioiu, Simona Ceauşescu (sub tipar), Anal. Univ. Buc. Biol. (1978).
14. Adela Ştefan, N. Stăncioiu, Simona Ceauşescu, Elena Sibiceanu, St. Cerc. Biol. Animală, Acad. R.S.R., **28** (1976).
15. I. R. Tinsley, Biochem. Pharmac., **14**, 847 (1965).
16. A. Troncone, F. Stancof, Zooprofilassi, Italia, **24**, 372 (1971).

COMPORTAREA CATALAZEI ERITROCITARE ÎN ANEMIA HEMOLITICĂ PRIN DEFICIT DE GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZĂ

NINA CHEŢA, M. ŞERBAN

Rezumat. În anemia hemolitică prin deficit de G6PDH se constată o scădere a activităţii catalazei cuplată cu scăderea vitezei de reducere a metHb, ceea ce poate determina mărirea vulnerabilităţii acestor eritrocite.
Investigarea catalazei în acest tip de anemii, deşi nu evidenţiază valori deosebit de scăzute poate constitui — alături de alte teste enzimatice — un indice util atît pentru diagnostic, cît şi pentru lămurirea mecanismului enzimatic, al hemolizei medicamentoase.

Deficienţa în glucozo-6-fosfat dehidrogenază (G6PDH) este enzimopatia cea mai răspîndită şi implicit cea mai studiată. Glicoliza din eritrocit la pacienţii cu deficit în G6PDH este normală, atît timp cît nu intervine o agresiune medicamentoasă sau de altă natură. Cercetările efectuate în ultimul timp au evidenţiat în cazul acestui deficit enzimatic şi alte anomalii biochimice, puse în evidenţă la nivelul echipamentului enzimatic al eritrocitului.

Catalaza eritrocitară (F.C.1.11.16 : $H_2O_2 - H_2O_2$ oxidoreductaza) este o enzimă care nu intervine în glicoliză, dar serveşte la protejarea hemoglobinei împotriva oxidărilor prin descompunerea apei oxigenate.

Ţinînd seama de rolul pe care îl îndeplineşte catalaza eritrocitară în această lucrare s-a urmărit variaţiile activităţii şi comportarea electroforetică ale acestei enzime în cadrul unor familii de pacienţi — în mare parte mamă şi copil — cu anemie hemolitică prin deficit enzimatic de G6PDH.

MATERIAL ŞI METODE

Eritrocitele provenind de la 20 pacienţi cu deficit enzimatic de G6PDH au fost spălate şi hemolizate. Din hemolizat s-au efectuat determinări spectrofotometrice asupra activităţii catalazei (1), precum şi analiza electroforetică în gel de amidon a catalazei (2) şi a G6PDH (5).

Activitatea catalazei eritrocitare a fost exprimată în mEq H_2O_2 descompusă în timp de 10 secunde; limitele normale ale activităţii catalazei eritrocitare sînt considerate între 1,2 — 1,5 mEq H_2O_2 descompusă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele prezentate în figura 1, rezultă că activitatea catalazei în hemolizatul pacienţilor cu deficit enzimatic de G6PDH este mai scăzută faţă de lotul de normali.

Datele sînt în concordanță și cu unele cercetări făcute de Tarlow însă pe alte cazuri și în alte condiții (3). Concentrația de catalază în eritrocitele umane prezintă valori mai mari decît în oricare alt țesut, fapt

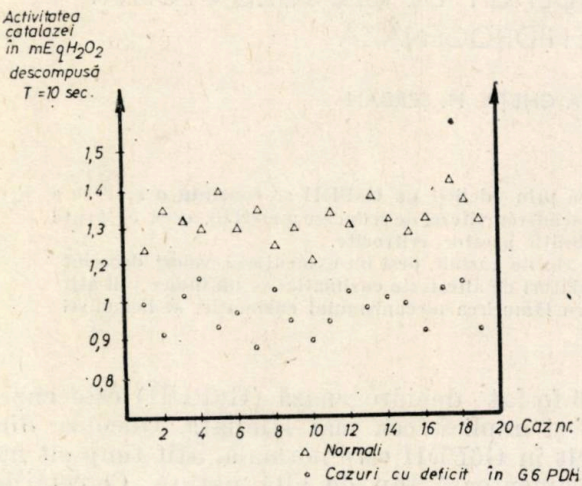


Fig. 1 — Valorile activității catalazei eritrocitare la un lot de normali și de pacienți cu deficit enzimatic de G6PDH.

care sugerează că această enzimă are o funcție importantă în metabolismul eritrocitului.

Pînă de curînd s-a postulat că singura funcție a catalazei ar fi de a descompune apa oxigenată în oxigen molecular și apă :

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Totuși ,catalaza poate fi implicată în metabolismul glucidelor, acționînd drept peroxidază în diferite reacții de oxidoreducere.

Pe de altă parte, Jandel (4) a prezentat dovada care indică faptul că etapa inițială către moartea eritrocitului este oxidarea hemoglobinei (Hb) la methemoglobină (metHb). Catalaza poate proteja Hb de oxidare la metHb. Dar, peroxidul de hidrogen în exces pe cale de a se acumula datorită activității scăzute a catalazei, poate contribui la oxidarea Hb și a altor componenți celulari.

Formarea excesivă de metHb, prin scăderea activității catalazei, asociată cu viteza scăzută de reducere a metHb datorită vitezei mici de regenerare a NADPH în cazul eritrocitelor deficitare în G6PDH, poate contribui la mărirea vulnerabilității acestor eritrocite. Din analiza electroforetică a G6PDH (fig. 2) și a catalazei (fig. 3) la pacienții investigați se constată că atît G6PDH cît și catalaza prezintă o bandă de activitate cu intensitate apropiată de normal la pacienții cu un deficit parțial de G6PDH (în cazul nostru — mama) și o bandă de intensitate scăzută a activității catalazei la copil, indiferent de sex, iar activitatea electroforetică a G6PDH este zero numai la copii de sex masculin care prezentau un deficit total de G6PDH.

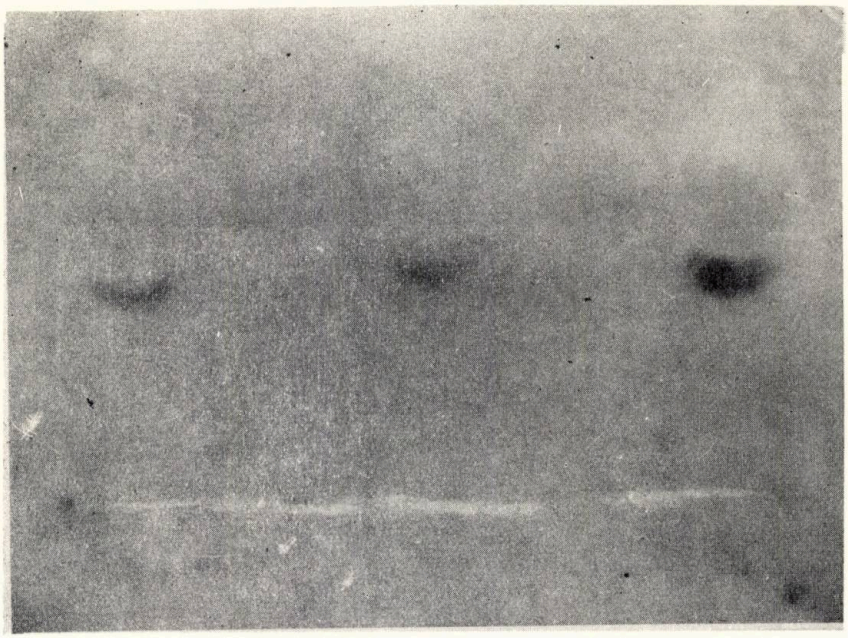


Fig. 2. — Electroforeza în gel de amidon a G6PDH; Mama-deficit parțial; copil-deficit total.

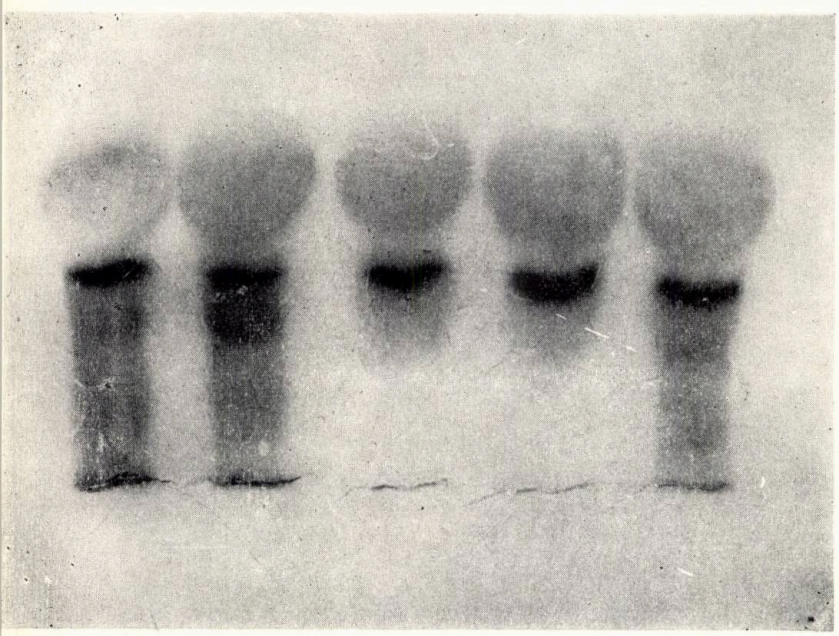


Fig. 3. — Electroforeza în gel de amidon a catalazei eritrocitare. Mama-deficit parțial; copil-deficit total.

Acest fapt se poate explica prin ipoteza că deficitul în G6PDH este transmis printr-o ereditate legată de sex. Studiul repartiţiei deficitului enzimatic a semnalat că femeia purtătoare a deficitului poate fi homozigotă XX — deci hiposensibilă — sau heterozigotă Xx, caracterul deficitar fiind atenuat prin gena normală, purtătoarea manifestîndu-se ca deficitară de tip intermediar sau normal. Bărbatul purtător de deficit enzimatic, neputînd fi decît heterozigot XY, este hipersensibil deci cu un deficit marcat.

CONCLUZII

În anemia hemolitică prin deficit de G6PDH se constată o scădere a activităţii catalazei care ar putea fi cuplată cu scăderea vitezei de reducere a metHb, ceea ce poate determina mărirea vulnerabilităţii acestor eritrocite. Investigarea catalazei în acest tip de anemii deşi nu evidenţiază valori deosebit de scăzute, poate constitui — alături de alte teste enzimatice — un indice util, atît pentru diagnostic, cît şi pentru lămurirea mecanismului enzimatic al hemolizei medicamentoase.

Autorii exprimă mulţumiri Centrului de Hematologie din Bucureşti şi Clinicii de Hematologie Fundeni (prof. dr. doc. Şt. Berceanu) pentru sprijinul acordat în furnizarea cazurilor investigate.

Primit la redacţie
la 8 iunie 1977

Institutul de Medicină Internă „N. Gh. Lupu"
Facultatea de Zootehnie
Disciplina de Biochimie
Bucureşti

LE COMPORTEMENT DE LA CATALASE ÉRYTHROCYTAIRE DANS L'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE PAR DÉFICIT DE G-6-PDH

RÉSUMÉ

Dans l'anémie hémolytique par deficit de G-6-PDH on constate une baisse de l'activité de la catalase et de la vitesse de réduction de la Méthémoglobine, ce qui peut accroître la vulnérabilité des érythrocytes.

L'investigation de la catalase dans ce type d'anémie, bien qu'elle ne révèle pas de valeurs particulièrement basses, peut constituer, en association avec d'autres tests enzymatiques, un indice utile tant pour le diagnostic que pour l'explication du mécanisme enzymatique de l'hémolyse médicamenteuse.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Polonovski, *Exposées annuels de Biochimie médicale*. **139**, (1969) Ed. Masson, Paris.
2. G. R. Tudhope, Nature. **205**, 404 (1965).
3. A. Tarlov, G. Brewer, J. Lab. Clin. med., **56**, 796 (1960).
4. H. Jandel, J. Clin. Invest., **39**, 1 818 (1960).
5. S. Boyer, I. Porter, Proc. Nat. Acad. Sci., **48**, 1868 (1962).

VARIAŢII CANTITATIVE ALE GLUTATIONULUI REDUS ŞI OXIDAT ÎN ANEMIA HEMOLITICĂ PRIN DEFICIT DE GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZA

NINA CHEŢA, M. ŞERBAN

Rezumat. În anemia hemolitică prin deficit enzimatic de G6PDH se produce o diminuare a valorilor GSH, concomitent cu o creştere a valorii GSSG. Diminuarea GSH este asociată cu o activitate scăzută sau nulă a G6PDH. Modificarea raportului glutation redus/glutation oxidat poate constitui, pe lîngă alte modificări de ordin hematologic, un indice biochimie de diagnosticare a unei anemii hemolitice enzimopenice.

Cercetările referitoare la metabolismul glutationului relevă—între altele — că eritrocitele bătrîne prezintă un deficit important de glucozo-6-fosfat dehidrogenază (G6PDH). (1). Energia necesară funcţiilor eritrocitare este furnizată de degradarea glucozei pe cale anaerobă, proces prin care se generează ATP, asigurîndu-se, totodată, şi menţinerea sistemelor oxido-reducătoare ale celulei. Aceste sisteme sînt multiple şi indispensabile realizării proceselor biochimice şi funcţionale ale eritrocitului.

Pornind de la faptul că glutationul redus şi oxidat constituie un important sistem redox al eritrocitului, în această notă ne-am propus să urmărim variaţiile cantitative ale glutationului redus (GSH) şi ale glutationului oxidat (GSSG) din hemolizatul eritrocitar provenit de la familii de pacienţi cu anemie hemolitică prin deficit enzimatic de G6PDH.

Scopul acestor cercetări a fost de a stabili unele corelaţii între comportarea glutationului şi activitatea G6PDH din eritrocit, ca modalitate de caracterizare biochimică a anemiei hemolitice nesferocitare.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe hemolizat eritrocitar provenit de la 24 de pacienţi cu deficit parţial sau total de G6PDH, paralel cu un lot de normali.

Activitatea G6PDH s-a determinat prin metoda Kornberg (6), glutationul redus prin metoda descrisă de Beutler (2), iar glutationul oxidat prin metoda Bracci (3).

Activitatea G6PDH prezintă valori normale între limite 5 — 9UI; iar valorile normale ale GSH şi GSSG sînt considerate între limitele 6,57 $\pm$ 1,04 μmoli GSH/gHb şi respectiv 0,0123 $\pm$ 0,0045 μmoli GSSG/Hb.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele prezentate în figurile 1, 2, 3, rezultă că în anemia hemolitică prin deficit în G6PDH se produce o scădere a GSH şi respectiv o creştere a GSSG.

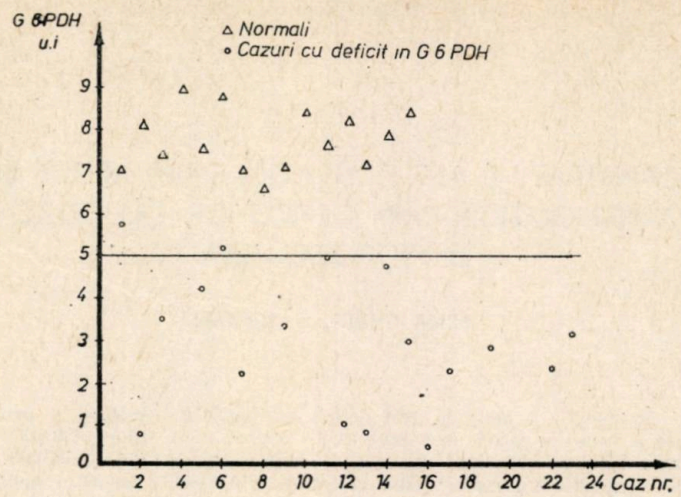


Fig. 1. — Valorile activității G6PDH la un lot de normali și la pacienți cu deficit enzimatic în G6PDH.

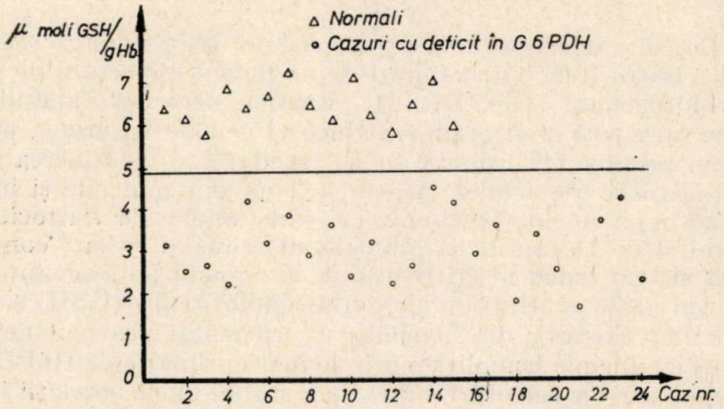


Fig. 2. — Valorile activității GSH la un lot de normali și la pacienți cu deficit enzimatic în G6PDH.

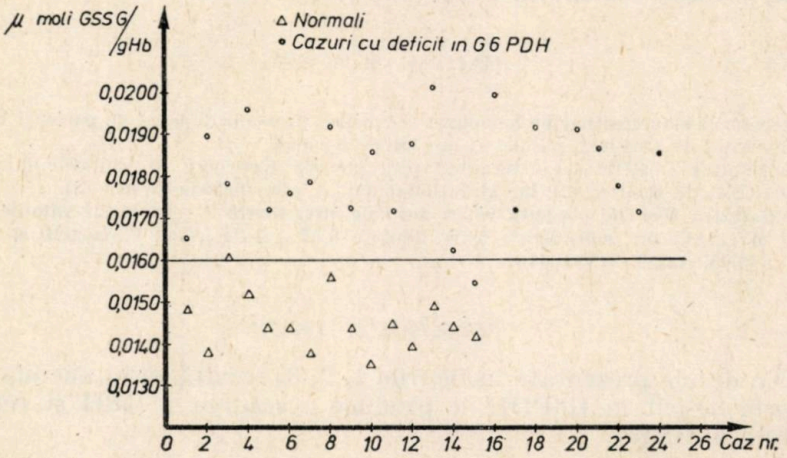


Fig. 3. — Valorile activității GSSG la un lot de normali și la pacienți cu deficit enzimatic în G6PDH.

Deasemenea se constată că raportul GSH/GSSG este mult mai scăzut la pacienții de sex masculin, care au activitatea zero sau aproape de zero (Tabela 1). Rezultatele obținute concordă cu unele date din literatură, privind modificările GSH în eritrocitele deficitare în G6PDH(1).

Tabela 1

Activitățile G6PDH, GSH° GSSG și raportul GSH/GSSG la pacienții cu anemie hemolitică prin deficit enzimatic în G6PDH.

Nr.	Pacientul	Sex	G6PDH UI.	GSH μmoli GSH/Hb	GSSG μmoli GSSG/Hb	Raport GSH/GSSH
1.	G.M	f.	5,8	3,1	0,0165	203
2.	G.R	m.	0,81	2,5	0,0190	131
3.	Z.F	f.	3,5	2,7	0,0178	151
4.	Z.A	m.	0	2,1	0,0197	106
5.	F.A	f.	4,3	4,3	0,0173	255
6.	F.V	m.	5,3	3,3	0,0176	131
7.	W.M	f.	2,3	3,9	0,0179	217
8.	W.A	m.	0	2,9	0,0193	150
9.	D.M	f.	3,4	3,6	0,0173	208
10.	D.C	m.	0	2,4	0,0187	127
11.	G.F	f.	5	3,3	0,0172	185
12.	G.M	m.	1	2,3	0,0188	122
13.	S.D	m.	0,8	2,6	0,0203	128
14.	H.I	f.	4,8	4,5	0,0163	279
15.	P.A	f.	3	4,2	0,0155	270
16	P.G	m.	0,5	2,8	0,0200	140
17	M.I	m.	2,4	3,6	0,0172	209
18.	M.D	f.	0	1,8	0,0193	94
19	G.M	f.	2,9	3,4	0,0186	130
20.	C.I	m.	0	2,5	0,0191	130
21	M.I	m.	0	1,6	0,0189	85
22.	M.D	f.	2,4	3,7	0,0177	207
23.	M.O	f.	3,3	4,3	0,0171	187
24.	M.N	m.	0	2,3	0,0186	123

Se știe că agenții hemolizanți conduc la formarea de peroxid de hidrogen. Cohen și Hochstein (5) atrag atenția asupra rolului glutation peroxidazei în reducerea peroxidului de hidrogen, conform reacțiilor.

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{\text{glutation peroxidază}} 2\ H_2O + GSSG$$

$$GSSG + NADP + 2H^+ \xrightarrow{G\ 6\ PDH} 6\text{-fosfogluconat} + NADP + H^+$$

Insuficienta producere de NADPH datorată deficitului de G6PDH conduce la o incapacitate de menținere a nivelului GSH în prezența peroxidului de hidrogen (4).

Eritrocitul normal se poate autoapăra, atît prin reducerea GSSG la GSH, cît și prin reducerea disulfitului hemoglobinei, prin intermediul reacției glutation reductazică, avînd ca sursă NADPH. Celulele deficitare în G6PDH sînt incapabile să reducă într-o concentrație adecvată $NADP^+$ la NADPH, formîndu-se astfel eritrocite cu corpi Heinz captate de pulpa splenică și scoase apoi rapid din circulație[5]

Scăderea conținutului în GSH și respectiv modificarea raportului GSH/GSSG se corelează atît cu deficitul enzimatic în G6PDH, cît și

cu funcția atribuită GSH în menținerea integrității membranei eritrocitului (7).

În acest sens, depleția GSH se manifestă prin imposibilitatea exercitării funcției sale la nivelul membranei, constituind astfel unul din factorii implicați în anemia hemolitică prin deficit de G6PDH.

CONCLUZII

În anemia hemolitică prin deficit enzimatic de G6PDH se produce o diminuare a valorilor GSH, concomitent cu o creștere a valorii GSSG. Diminuarea GSH este asociată cu o activitate scăzută sau nulă a G6PDH.

Modificarea raportului glutation redus/glutation oxidat poate constitui, pe lîngă alte modificări de ordin hematologic, un indice biochimic de diagnosticare a unei anemii hemolitice enzimopenice.

Autorii exprimă mulțumiri Centrului de Hematologie din București și Clinicii de Hematologie Fundeni (prof. dr. doc. St. Berceanu) pentru sprijinul acordat în furnizarea cazurilor investigate.

Primit la redacție
la 8 iunie 1977

Institutul de Medicină Internă
„N. Gh. Lupu"
Facultatea de Zootehnice
Disciplina de Biochimie
București

LES VARIATIONS QUANTITATIVES DU GLUTATHION RÉDUIT ET DU GLUTATHION OXYDÉ DANS L'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE PAR DÉFICIT ENZYMATIQUE DE G6PDH

RESUMÉ

Dans l'anémie hémolytique par déficit enzymatique de G6PDH on assiste à une diminution des valeurs du GSH simultanément à une augmentation de celles de GSSG. La baisse de GSH s'accompagne d'une activité basse ou nulle de la G6PDH.

La modification du raport glutathion réduit/glutathion oxydé peut constituer, en même temps que d'autres modifications d'ordre hématologique, un indice biochimique pour le diagnostic d'une anémie hémolytique enzymopénique.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Beutler, J. Lab. Clin. Med, **49**, 84 (1957).
2. E. Beutler, *Red cell metabolism — A manual of Biochemical methods* Ed. Grune and Stratton, 1971.'
3. I. Bracci, N. Calabri, Clin. Chim. Acta, **29**, 345 (1970).
4. P. Carson, Proc. Roy. Soc. Med., **63**, 175 (1970).
5. G. Cohen, P. Hochstein, Science, **134**, 1 756 (1961).
6. A. Kornberg, B. Horecker, *Methods in Enzymology*, 323, Ed. Academic Press New York 1955.
7. M. Kosower, Biocem. Biophys. Acta, **33**, 192 (1969).

EFECTUL IRADIERII PIRUVATULUI ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE A LACTAT-DEHIDROGENAZEI

ANCA MĂLINA COANDĂ, P. MURGOCI, TAMARA DIACONESCU, S. COMOROŞAN

Rezumat. Scopul acestei lucrări este de a descrie o serie de date tehnice necesare reproducerii „efectului perturbării moleculelor organice cu lumină din domeniul vizibil" ($\lambda = 546$ nm). Sistemul enzimatic ales este lactat dehidrogenaza. Datele tehnice cuprind: montajul şi procedeul de iradiere, prepararea probelor pentru iradiere, parametri cinetici optimi pentru obţinerea efectului.

În ultimii ani, laboratorul nostru a prezentat o serie de lucrări asupra „efectului perturbării moleculelor organice prin iradiere cu lumină din domeniul vizibil şi UV apropiat", observaţie experimentală surprinzătoare. Efectul constă în apariţia unor creşteri de viteză enzimatică în urma iradierii (sub formă de pudră cristalină) a substratului enzimatic S, specific unei enzime date E_s. Maximum de creştere de viteză se obţine pentru iradieri cu $\lambda = 546$ nm. Creşterile de viteză de reacţie apar la anumiţi timpi de iradiere generaţi de formula

$$t_i = t_m + (i - 1)$$

unde, $i = 1, 2, 3, \ldots$; t_m este primul timp de iradiere ce produce creşterea de viteză, iar τ intervalul constant dintre două creşteri consecutive (1, 2, 3). Cercetările noastre au arătat că t_m şi τ apar ca parametri enzimatici dependenţi de originea biologică a enzimei. Investigarea acestor parametri $-t_m$ şi τ pentru un număr mare de sisteme enzimatice din diverse surse biologice, au relevat posibilitatea existenţei unui nou mecanism de control (5). Interesul şi implicaţiile profunde pentru biochimia celulară ale efectului descris de noi este dovedit şi de lucrările apărute în literatura de specialitate (6, 7, 8, 9).

Datorită faptului că reproductibilitatea fenomenului este strict dependentă de o serie de parametri neuzuali în experimentele de cinetică enzimatică şi respectiv în cele de fotochimie, ne-am propus în această lucrare aprofundarea studiului acestor parametri, în sensul furnizării unor noi date tehnice ce ar putea sprijini investigaţiile ulterioare. Sistemul enzimatic ales de noi este reacţia:

$$\text{Piruvat} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat}$$

MATERIAL ŞI METODE

1. *Prepararea probelor pentru iradieri.* Piruvatul sub formă de pudră, bine uscată, a fost împrăştiat uniform (în fiole de sticlă) pe o suprafaţă cu diametrul de 18—20 mm. Utilizarea iniţială a fiolelor de material plastic a dus la obţinerea de rezultate nereproductibile, datorită electrizării lor. Dat fiind faptul că, piruvatul este hidroscopic, probele trebuiesc ţinute în exicator pînă în momentul iradierii; iradierea piruvatului umed nu duce la apariţia efectului. Pentru probele martor s-au respectat aceleaşi condiţii, exceptînd iradierea.

2. *Sistemul de iradiere.* *a*) Aparatul de iradiere (fig. 1) se compune din:

— o sursă de iradiere, ce poate fi o lampă de mercur de înaltă tensiune sau un bec de tungsten.

— Un obturator cu o fantă circulară cu un diametru de 25 mm, montat la o distanţă de 20—40 mm de sursă.

— O diafragmă electronică pentru modularea timpului de iradiere, de tip UniBlitz model 100—2 Vincent Ass. cu o precizie de expunere de 10^{-3} s.

— Un filtru optic pentru selectarea lungimii de undă, pe care noi l-am montat sub diafragmă, dar care în principiu, poate fi aşezat oriunde între sursă şi proba de iradiat. În lucrare am folosit un filtru interferenţial Dietric Optics 546 Hg-mono cu 3 cavităţi, transmitanţă 65%, $\lambda = 8{,}8$ nm la 1/2 transmitanţă.

— Un luxmetru pentru măsurarea iluminării. Noi am utilizat un footcandlemeter Gossen-Panlux.

Toate aceste componente au fost aranjate pe un banc optic în poziţie verticală.

b) Sursa de iradiere. Pentru iradiere se pot folosi fie lămpi de mercur de înaltă presiune fie becuri de tungsten. În lucrare am utilizat ambele tipuri de surse de iradiere, rezultatele fiind similare. Sursele cu bec de tungsten sînt indicate în studiul efectului ca funcţie de iluminarea probei, pentru că se poate modifica variaţia iluminării probei prin modificarea tensiunii aplicate pe filament, lăsînd neschimbată geometria montajului de iradiere.

Ca sursă de mercur am utilizat lampa UV—IR—1, căreia i-am izolat inelul de infraroşu cu un fir de asbest, iar ca surse de tungsten becuri General Electric tip EJV 150 W, 21 V.

O menţiune specială trebuie făcută în cazul utilizării becurilor de tungsten: filamentul lor trebuie să fie liniar şi aşezat în poziţie orizontală. Utilizarea unor becuri cu filament circular sau liniar, dar în poziţie verticală (noi am utilizat şi un astfel de bec tip Sylvania ELH 300 W, 120 V) nu duce la obţinerea unor rezultate bune. Acest fapt ar putea fi datorat necesităţii ca fascicolul luminos să aibă o anumită „geometrie".

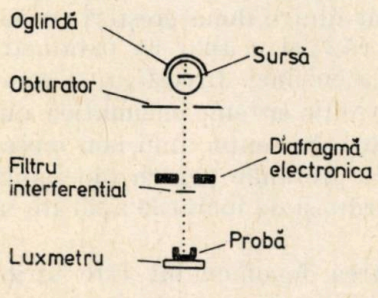


Fig. 1. — Sistemul de iradiere.

c) Procedeul de iradiere. Aranjamentul sistemului de iradiere trebuie să producă pe probă o iluminare uniformă de peste 400 fc (1. fc = 10,764 lx); diametrul petei luminoase nu trebuie să depăşească 25 mm în diametru.

Un aspect important îl constituie constanţa iluminării în timpul iradierii. Noi am observat că fluctuaţii ale iluminării probei de peste ± 10 fc conduc la rezultate nereproductibile. Pentru a verifica acest aspect, am aşezat fiola cu substanţa ce urmează a fi iradiată direct pe fotocelula luxmetrului şi am urmărit variaţia iluminării în timpul iradierii. Am observat de asemenea, că există o dependenţă strictă a efectului faţă de înălţimea sursei de iradiere. În geometria descrisă mai sus, distanţa dintre probă şi lampă trebuie să fie între 120—135 mm pentru becurile de tungsten şi între 140—165 mm pentru lampa de mercur.

3. *Mediul de reacţie:* 1,82 nmoli piruvat de sodiu (Serva), 0,46 nmoli NADH (Sigma), într-un volum final de 3 ml tampon fosfat 0,05 M pH 7,4. Reacţia a fost iniţiată la 30°C cu 0,2—0,3 μg lactat dehidorgenază (Calbiochem, Rabbit muscle cryst. in 2.2 M $(NH_4)_2SO_4$ 5890 UI per ml), urmărindu-se scăderea absorbţiei NADH la 340 nm, timp de 60 s. Reacţia a fost urmărită pe un Spectrofotometru Calbiometer LC—340 digital.

Probele iradiate şi neiradiate au fost lucrate în aceleaşi condiţii folosind o secvenţă de lucru martor-probă-martor ... pentru a exclude orice posibilitate de eroare prin variaţia activităţii lactic dehidrogenazei. Pe toată durata experimentelor soluţia enzimatică stoc a fost ţinută în ghiaţă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Experimentele au arătat că în cazul LDH din mușchi de iepure, iradierea piruvatului cu 5,35, 65, ... s, duce la o creştere a vitezei de reacţie, creştere observată într-un interval de 60 sec de la iniţierea ei (10).

Timpii de iradiere intermediari testaţi nu au influenţat viteza de reacţie, valorile medii ale vitezei iniţiale situîndu-se în domeniul de valori ale martorilor. Amplitudinea creşterilor vitezei nu depinde de numărul i (vezi formula 1) al timpului de iradiere eficient şi apare ca un semnal în activitatea enzimei. Forma semnalului este o gausiană centrată pe t_i, iar timpi de iradiere de tipul $t_i \pm 0{,}2$ s nu mai produc efect (10). Acest aspect fundamental al fenomenului a fost verificat efectuîndu-se o serie de experimente în care experimentatorul nu cunoaşte tipul probelor (iradiate sau ne iradiate) pentru a exclude factorul subiectiv din experiment. O serie de rezultate obţinute în acest mod sînt date în tabela 1. După

Tabela 1

Nr. exp.	Proba $/\Delta A_{340\,nm} \cdot min^{-1}$							
	A	timp iradiere (s)	*B*	timp iradiere (s)	*C*	timp iradiere (s)	*D*	timp iradiere (s)
1	0,490	0	0,514	5	0,488	0	0,512	5
2	0,491	0	0,510	5	0,510	5	0,490	0
3	0,508	5	0,488	0	0,506	5	0,486	0
4	0,492	0	0,492	0	0,514	5	0,512	5
5	0,494	0	0,516	5	0,492	0	0,516	5
6	0,508	5	0,510	5	0,490	0	0,490	0
7	0,488	4	0,508	5	0,484	6	0,484	0
8	0,504	5	0,484	4	0,482	6	0,484	0
9	0,482	0	0,484	6	0,486	4	0,506	5
10	0,488	6	0,488	0	0,510	5	0,488	4

cum observăm, din această serie de experimente, rezultatele studiului sînt pozitive, factorul subiectiv trebuind să fie exclus din explicarea fenomenului. Experienţe de acest tip au fost efectuate şi de G. Bass cu acelaşi rezultat pozitiv (11).

Un al doilea grup de probleme studiate l-au constituit problemele de cinetică enzimatică: dependenţa mărimii efectului de concentraţia de substrat şi de enzimă în mediu de reacţie şi legat de acestea, determinarea constantei Michaelis-Menten pentru piruvat iradiat şi ne iradiat.

Rezultatele obţinute au arătat că:

— o concentraţie scăzută de piruvat nu duce la diferenţe semnificative între probele iradiate şi neiradiate. Diferenţa maximă se obţine în apropierea vitezei maxime de reacţie (fig. 2);

— pentru o concentraţie de 0,6 mM piruvat în probă, cantitatea de enzimă folosită trebuie să corespundă unei viteze cuprinse între 0,400 — 0,600 $\Delta A_{340\,nm} \cdot min^{-1}$ pentru a obţine efectul maxim (fig. 3);

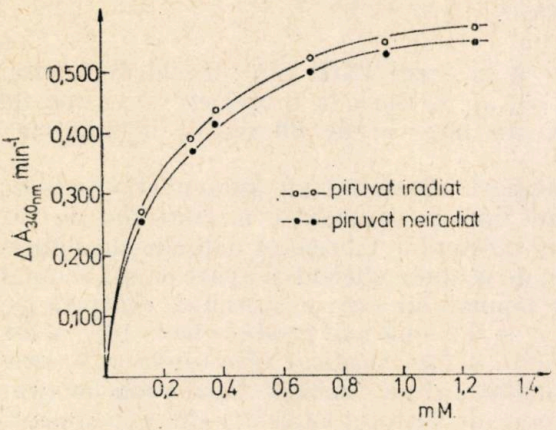


Fig. 2. — Dependența vitezei de reacție de concentrație de piruvat din mediul de reacție.

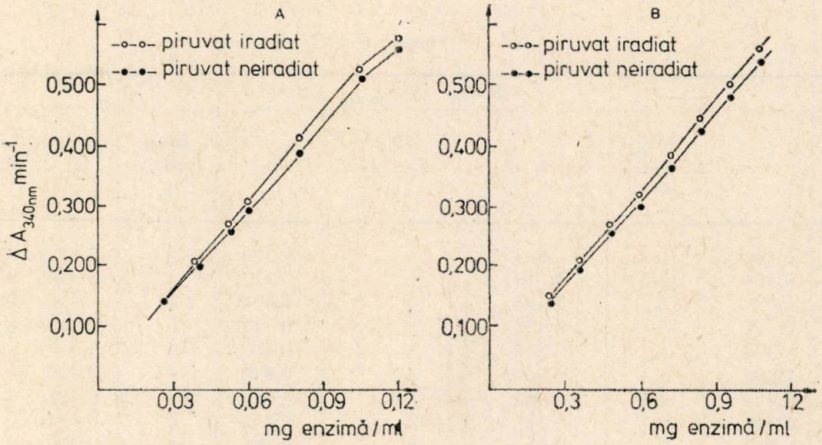


Fig. 3. — Dependența vitezei de reacție de concentrație de enzimă, din mediul de reacție; *A* — LDH Calbiochem rabbit muscle; *B* — LDH — parțial purificat — din mușchi de iepure.

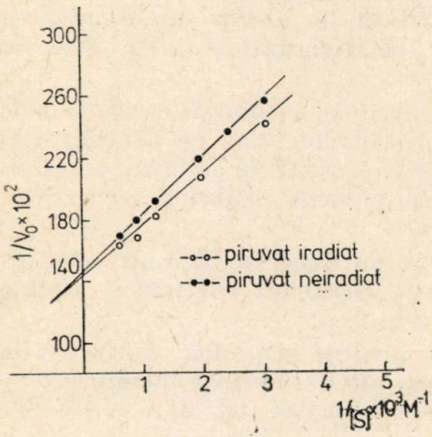


Fig. 4. — Determinarea grafică a valorii Km după Leneveawer-Burk.

— calculul constantelor Michaelis-Menten a arătat că pentru piruvatul iradiat constanta Michaelis-Menten este mai mic. De asemenea, forma celor două grafice indică o cinetică cu activator pentru probele iradiate faţă de probele martor, cu alte cuvinte, practic, nu se modifică viteza maximă ci numai constanta Michaelis-Menten (fig. 4).

CONCLUZII

Pentru reproducerea efectului iradierii substratelor enzimatice este necesar ca să se respecte riguros următorii parametrii de lucru :

a) realizarea geometriei optime în procesul de iradiere ;

b) alegerea condiţiilor optime de cinetică enzimatică.

Prezentat la redacţie
la 15 septembrie 1977

Spitalul Clinic FUNDENI
Şos. Sportului nr. 37
sector 2, Bucureşti

THE EFFECT OF PYRUVATE IRRADIATION ON THE LACTATE-DEHYDROGENASE ACTIVITY

SUMMARY

This paper describes a series of parameters necessary for the reproductibility of the „effect of organic molecules perturbation by visible light" ($\nu = 546$ nm). The lactate dehydrogenase system is used.
The parameters refer to : irradiation set-up, irradiation procedure and kinetic parameters.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroşan, Nature, **227**, 64 (1970).
2. S. Comoroşan, M. Cru and S. Vieru, Enzymologia, **42**, 31 (1972).
3. S. Comoroşan, S. Vieru and P. Murgoci, Biochim. Biophys. Acta, **268**, 620 (1972).
4. S. Comoroşan, D. Crişan, E. Alexandrescu and P. Murgoci, Physiol. Chem. & Physics, **4**, 559 (1972).
5. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Sandru, and P. Murgoci, Physiol. Chem. & Physics, **3**, 1 (1971).
6. R. Sherman, S. Siebert and W. Yee, Physiol. Chem. & Physics, **5**, 49 (1973).
7. G. Bass and D. Crişan, Physiol. Chem & Physics, **5**, 331, (1972).
8. B. Goodwin, S. Vieru and B. Blanchard, Physiol. Chem. & Physics, **7**, 89 (1975).
9. S. Comoroşan, in Progress in Theoretical Biology, ed. by R. Rosen, and F. Snell, Acad. Press, N. Y. vol. 4, p. 161 (1976).
10. S. Comoroşan, Int. Quantum Chem. Quantum Biology Symp. Nr. **1**, 221 (1976).
11. G. E. Bass, D. Sandru, J. E. Chemerey & E. T. Bucovaz, Physiol. Chem. & Physics, **8**, 253 (1976).

INVESTIGAREA LACTATDEHIDROGENAZELOR DIN TUMORI CU SUBSTANŢE IRADIATE

ŞTEFANIA MARCOVSCHI, DOMNIŢA CRIŞAN şi SILVIA VIERU

Rezumat. Iradierea substratelor enzimatice cu lumină de $\lambda = 546$ nm induce creşteri periodice ale vitezei de reacţie în reacţia enzimatică specifică. Lactatdehidrogenazele purificate din diferite surse de celule normale şi tumorale sînt investigate cu substrate iradiate, piruvat sau respectiv lactat. În tumori se obţine un efect particular : sistemul enzimatic răspunde cu o creştere a vitezei iniţiale numai în reacţia piruvat ⇒ lactat, cînd este testat cu piruvat iradiat. Nu se obţin asemenea efecte în reacţia lactat ⇒ piruvat, cînd enzima este testată cu lactat iradiat. Aceasta pare o nouă caracteristică metabolică tumorală cu implicaţii deosebite în mecanismele de control metabolic din tumori.

Lucrarea investighează un nou mecanism de control metabolic al activităţii lactatdehidrogenazelor tumorale, izolate şi purificate din celule de hepatom RS_1 de tip carcinom alveolar şi din epiteliom Guerin T_8. Modelul experimental constă în investigarea parametrilor t_m şi τ (1, 2, 3, 4, 5, 6) pentru aceste sisteme enzimatice. Iradierea substratului enzimatic induce creşteri semnificative ale vitezei de reacţie. Acest efect apare numai la anumiţi timpi de iradiere a substratului enzimatic. Efectul este caracterizat prin cei doi parametri determinaţi de enzimă şi specifici fiecărui sistem enzimatic investigat. Compararea valorilor acestor parametri pentru lactatdehidrogenazele din celulele normale şi din celulele tumorale a evidenţiat diferenţe semnificative, acestea putînd constitui o deviere a unor mecanisme de control metabolic în celulele tumorale.

MATERIALE ŞI METODE

1. *Surse de celule tumorale utilizate pentru izolarea şi purificarea LDH* : — Celule Hepatom RS_1 de tip carcinom mucipar alveolar sînt induse cu acetilaminotoluol. Transplantarea este efectuată prin implantarea subacută la şobolani Wistar. Ţesutul tumoral este recoltat după 20 zile, spălat în ser fiziologic rece, omogenizat, extras de două ori cu 1 vol. apă bidistilată rece timp de 10 minute sub agitare continuă şi filtrat. Ph-ul filtratului este ajustat la 7,5 cu NaOH 1 N şi utilizat ca material pentru purificarea ulterioară a LDH.

— Celule Epiteliom Guerin T_8 sînt cultivate timp de 10 zile pe şobolani Wistar. Transplantarea este efectuată prin implantare subcutană. Ţesutul tumoral este recoltat, spălat în ser fiziologic rece, omogenizat şi extras ca şi în cazul celulelor de hepatom. Extractul este utilizat pentru purificarea ulterioară a LDH.

2. *Preparate enzimatice:* LDH este izolată şi purificată după metoda Pesce (7) preconizată pentru purificarea enzimei dintr-o largă varietate de surse. Am utilizat pentru comparaţie ţesut muscular normal întrucît tumora RS_1 transplantată creşte pe ţesut musculat striat. LDH normal din muşchi striat de şobolan este obţinut astfel: ţesutul muscular recoltat de la 30 animale, spălat şi omogenizat se extrage timp de 3 ore sub agitare continuă cu tampon rece Tris-Cl 0,01 M—EDTA 0,001 M pH 7, 6, în raport cu 1 : 2 w/v. Extractul este filtrat şi centrifugat 20 min la 13 000 × g la rece. Supernatantul este utilizat pentru fracţionare cu sulfat de amoniu (7). Pentru prepararea LDH, supernatantul se utilizează pentru fracţionarea cu sulfat de amoniu conform metodei Pesce pînă la etapa ultimei precipitări atît pentru LDH muscular normal cît şi pentru LDH tumoral din ambele surse.

3. *Determinarea activităţii LDH*: în cursul purificării enzimei activitatea LDH a fost determinată pentru ambele sensuri ale reacţiei, la 25°C, utilizînd un spectrofotometru Beckman. Viteza iniţială în reacţia piruvat → lactat a fost determinată spectrofotometric urmărind viteza de oxidare a NADH conform metodei Pesce (8). S-au utilizat cuve de cuarţ de 1 cm. Mediu de reacţie : 0,39 μmoli NADH, 2 μmoli Na-piruvat, în tampon Tris-Cl 0,05 M, pH 7,5, volum final 3 ml. Reacţia este iniţiată prin adiţia enzimei. Concentraţia enzimei a fost ajustată astfel încît viteza de reacţie să fie liniară în primele 75 s şi suficientă pentru a determina o scădere a DO_{340nm} între 0,100 şi 0,200 în 60 s. Citirile s-au efectuat la intervale de 15 s. Viteza iniţială în reacţia lactat → piruvat a fost determinată spectrofotometric urmărind viteza de reducere a NAD. Mediul de reacţie : 4 μmoli litium-lactat, 2 μmoli NAD în tampon Tris-Cl 0,05 M, pH 7,5. Reacţia este iniţiată prin adiţia enzimei. Concentraţia enzimei a fost ajustată ca şi pentru reacţia inversă pentru a determina o creştere a DO_{340nm} între 0,100 şi 0,200 în 60 s. Aceleaşi condiţii şi medii de reacţie au fost utilizate şi în experimentele cu substrate iradiate. Activitatea enzimatică este exprimată ca $\Delta DO_{340nm}/60$ s. Soluţiile de enzimă sînt diluate în Tris Cl 0,1 M pH 7,5 imediat înainte de utilizare şi folosire numai pînă la 10 min. În acest interval nu s-au înregistrat scăderi de activitate enzimatică. Concentraţiile de proteină în preparatele enzimatice au fost determinate după metoda Lowry (9) cu serumalbumină de bou ca standard. În aceste condiţii experimentale s-a putut înregistra activitatea LDH cu o acurateţă de $\sim 2\%$.

4. *Procedura de iradiere:* sursa de iradiere este o lampă de Hg de înaltă presiune — General Electric tip GE 100—A_4/T. Expunerea substratului la timpii de iradiere selectaţi este determinată cu un dispozitiv tip Uni-Blitz model VA 100—2 controlat electronic printr-un Diversatron timer (Vincent Ass., Adv. Electro-Mechanical Eng. Rochester, USA). Diafragma cu apertura de 2,5 cm este amplasată deasupra discului de material plastic ce conţine probe de substrat de iradiat. Precizia de măsurare a timpilor de iradiere este de ordinul 0,001 s. Sursa de iradiere Hg este montată la 17 cm înălţime de suprafaţa ţintă de pulbere de substrat; un filtru optic LKB Hg — mono $\lambda = 546$ nm, cu transmitanţa 30% este interpus pentru selectarea lungimii de undă optime de 546 nm. Nivelul iluminării la suprafaţa stratului de substanţă a fost în toate seriile de experimente de 500 fc (aprox. 5.350 Lx), măsurat cu un lux-

metru electronic de tip Gossen Panlux. Probe de 3 mg Na-Piruvat şi respectiv 10 mg Li—L—lactat uniform răspîndite pe discuri de material plastic sînt iradiate, apoi solvite în apă bidistilată şi cantitatea corespunzătoare concentraţiei din mediul de reacţie este luată în lucru. Aceleaşi cantităţi de substrate neiradiate reprezintă martorii. Reacţiile martor cu substrate neiradiate sînt efectuate cu acelaşi preparat enzimatic şi în aceleaşi condiţii cu reacţiile ce utilizează substrate iradiate. Pentru fiecare timp de iradiere testat sînt efectuate 5 probe iradiate separat, fiecare lucrată în duplicat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Interacţiunea cîmp electromagnetic-substrate enzimatice pare să inducă un timp special de tranziţie S ⇒ S*. Starea S* astfel realizată prezintă două caracteristici deosebite: un timp de viaţă anormal de lung şi stabilitate în soluţie (10, 11, 12, 13). Datorită acestor două proprietăţi este posibilă detectarea stării S* în reacţia enzimatică specifică. S-a observat anterior că tranziţia S ⇒ S* se poate realiza numai la multipli de 5 s ai timpilor de iradiere. Nici o altă valoare intermediară nu a indus această tranziţie (14). Principalul efect experimental indus prin iradierea substrarului este apariţia periodică a creşterilor de viteză iniţială în reacţia enzimatică specifică. Aceste creşteri de viteză prezintă o strictă dependenţă de timpul de iradiere a substratului, apărînd numai la anumiţi timpi de iradiere. În reacţia lactatdehidrogenazică efectuată cu un preparat enzimatic din muşchi de şobolan normal, creşterile vitezei iniţiale sînt înregistrate numai cu piruvat iradiat 5, 35, 65, 95, 125 şi 155 s. Nu se obţine nici un efect dacă proba de piruvat este iradiată cu alţi timpi intermediari (tabela 1). Creşterile de viteză iniţială corespunzătoare acestor timpi de iradiere „eficienţi" notaţi cu t_m, $t_m + \tau$ şi $t_m + 2\tau$ sînt mai mari decît creşterile induse de ultimii trei timpi de iradiere „efi-

Tabela 1

Creşteria le vitezei iniţiale induse de Na-piruvatul*) sau Li-L-lactatul* iradiat, în reacţia lactatdehidrogenazică (enzimă purificată din ţesut muscular normal de şobolan).

Timp de iradiere a substratului	Reacţia piruvat ⇒ lactat $\Delta DO_{340\ nm} \cdot min^{-1}$ (medie ± D.S.	Timp de iradiere a substratului	Reacţia lactat ⇒ piruvat $\Delta DO_{340\ nm} \cdot min^{-1}$ (medie ± D.S.)
Control (substrat neiradiat)	0,133 ± 0,0025	Control (substrat neiradiat)	0,100 ± 0,0015
5 s = t_m	0,157 ± 0,0025	15 s = t_m	0,120 ± 0,0018
35 s = $t_m + \tau$	0,153 ± 0,0026	45 s = $t_m + \tau$	0,118 ± 0,0016
65 s = $t_m + 2\tau$	0,155 ± 0,0028	75 s = $t_m + 2\tau$	0,118 ± 0,0010
95 s = $t_m + 3\tau$	0,146 ± 0,0018	105 s = $t_m + 3\tau$	0,111 ± 0,0010
125 s = $t_m + 4\tau$	0,147 ± 0,0021	135 s = $t_m + 4\tau$	0,110 ± 0,0012
155 s = $t_m + 5\tau$	0,143 ± 0,0019	165 s = $t_m + 5\tau$	0,112 ± 0,0010

* Orice timpi de iradiere a substratului diferiţi de seriile t_m, $t_m + \tau$, $t_m + 2\tau$ etc. nu au indus creşteri de viteză iniţială, viteza de reacţie fiind în medie în domeniul de valori al controlului (martor cu substrat neiradiat).

cienţi", respectiv $t_m + 3\tau$, $t_m + 4\tau$, $t_m + 5\tau$. Perioada de timp fixă ce delimitează două creşteri succesive ale vitezei iniţiale de reacţie, notată τ are valoarea 30 s pentru enzima musculară normală. Acelaşi tip de experiment efectuat cu lactat iradiat a relevat valori diferite pentru parametrii t_m şi τ : $t_m = 15$ s, $\tau = 30$ s. Se observă astfel că efectul iradierii substratului se produce pentru ambele sensuri de reacţie în cazul LDH muscular normal. Valorile creşterilor de viteză obţinute pentru seriile t_m şi τ, comparativ cu vitezele reacţiilor martor pot fi validate statistic, în cadrul acurateţei tehnicilor enzimologice curente, dacă vitezele de reacţie sînt măsurate în condiţii de linearitate.

Menţionăm că aceleaşi valori ale parametrilor t_m' şi τ în ambele sensuri ale reacţiei LDH se obţin pe preparate enzimatice cu diferite grade de puritate, de la enzime din omogenate tisulare pînă la enzime purificate — cristalizate : preparate comerciale (10, 11, 12).

Efectele iradierii substratelor asupra vitezei de reacţie enzimatică pot avea multiple implicaţii biologice. Întrucît parametrii t_m şi τ sînt specifici pentru enzimă, acelaşi sistem enzimatic extras dintr-o sursă celulară anormală poate prezenta o comportare diferită faţă de substratul iradiat. Astfel, parametrii t_m şi τ pot fi diferiţi ca valoare de cei specifici pentru enzima normală. Ar fi deci de deosebită importanţă să se poată recunoaşte un sistem enzimatic anormal prin determinarea parametrilor t_m şi τ. Principalele rezultate experimentale obţinute cu preparatele LDH tumorale sînt următoarele : — valoarea τ este scăzută la 20 s comparativ cu cea normală de 30 s, dînd o serie t_m şi τ diferită pentru piruvatul iradiat ; — viteza de reacţie LDH nu prezintă nici o modificare în direcţia lactat ⇒ piruvat cînd sînt utilizate probe de lactat iradiat. Acest rezultat experimental poate fi semnificativ, considerînd acumularea de lactat din celulele tumorale. Pentru a vedea dacă acest efect reprezintă o caracteristică metabolică mai generală pentru celulele de origină tumorală, s-a extins studiul parametrilor t_m şi τ la LDH purificat din celulele de hepatom RS_1 şi epiteliom Guerin T_8. Efectul asupra reacţiei LDH a fost observat pentru ambele tipuri de celule tumorale, respectiv lipsa de răspuns la iradierea lactatului. LDH tumoral prezintă deci creşteri ale vitezei de reacţie numai în reacţia piruvat ⇒ lactat efectuată cu piruvat iradiat (tabela 2). Cele două aspecte ale comportării enzimelor tumorale pot căpăta o semnificaţie deosebită dacă sînt considerate în contextul metabolismului celulei tumorale. O caracteristică bine cunoscută a metabolismului tumoral este „punctul final comun" după ce procesul de dediferenţere este complet. Funcţiile restante sînt în principal corelate cu producerea de energie prin glicoliză anaerobă şi cu procesul de replicare, după ce numeroase mecanisme anabolice şi catabolice au dispărut. Acest concept de bază al dediferenţierii celulare este corelat cu o dediferenţiere a echipamentului enzimatic, tinzînd spre un tip tumoral comun (15, 16). De aceea scurtarea perioadei τ, similară cu cea înregistrată la alte „celule cu creşterea autonomă" ca *S. cerevisae* (11) se poate dovedi o caracteristică generală pentru aceste celule. Lipsa unui efect asupra vitezei iniţiale în reacţia lactat ⇒ piruvat în celulele tumorale pare de asemenea o carac-

teristică metabolică fundamentală. Acest aspect poate duce la o reconsiderare a acumulării de lactat în tumori. Întrucît conversiunea lactat ⇒ piruvat rămîne la nivelul de fond al reacției martor, creșterile de viteză

Tabela 2

Creșteri ale vitezei inițiale induse de substratele iradiate în reacția lactatdehidrogenazică pentru sistemele LDH de origine normală și tumorală.

Sursa celulară	Reacția piruvat ⇒ lactat ($\Delta DO_{340\ nm} \cdot min^{-1}$ medie ± S.D.)		Reacția lactat ⇒ piruvat ($\Delta D_{340\ nm} \cdot min^{-1}$ medie ± D.S.)	
	Control (piruvat (piruvat neiradiat)	Piruvat iradiat (t_m = 5 s)	Control (lactat) neiradiat)	Lactat iradiat (t_m = 15 s)
Țesut muscular normal	0,133 ± 0,0025	0,157 ± 0,0025	0,100 ± 0,0015	0,120 ± 0,0018
Celule Hepatom RS_1	0,120 ± 0,0010	0,138 ± 0,0015	0,096 ± 0,0013	0,095 ± 0,0015
Celule Epiteliom Guerin T_8	0,200 ± 0,0029	0,220 ± 0,0025	0,125 ± 0,0018	0,120 ± 0,0020

în reacția piruvat ⇒ lactat vor determina o deplasare a echilibrului reacției LDH spre producerea de lactat. O cantitate crescută de molecule de piruvat sînt astfel pierdute pentru ciclul Krebs și deci pentru secvența fosforilării oxidative. Acest efect poate contribui la oxidarea scăzută prin ciclu. O serie de consecințe indirecte ale acestei alterări metabolice duce la producția crescută de piruvat. Incapacitatea binecunoscută a celulelor tumorale de a face față unei produceri excesive de piruvat duce la conversiunea sa în lactat.

În acest context, rezultatele noastre care arată prezența creșterilor de viteză inițială numai în reacția piruvat ⇒ lactat subliniază aceste tulburări biochimice și sugerează capacitatea excesivă a celulelor tumorale de a produce lactat.

CONCLUZII

1. Investigarea acestor tranziții induse de iradiere se poate releva utilă în detectarea unor alterări metabolice în celula tumorală.

2. Acest model experimental ar putea fi utilizat pentru a detecta alterări ale unor mecanisme de control metabolic permițînd astfel investigarea biochimică și detecția precoce a procesului de dediferențiere a celulei tumorale.

Prezentat la redacție
la 12 iunie 1977.

Spitalul Clinic Fundeni
Șos. Fundeni, 258, sect. 2, Buc.
Laboratorul de Biochimie.

INVESTIGATION OF TUMOR LACTATE DEHYDROGENASES WITH IRRADIATED SUBSTRATES

SUMMARY

Irradiation of enzymic substrates with light of $\lambda = 546$ nm induces periodical reaction rate enhancements in the corresponding enzymic reaction. Purified lactate dehydrogenases from different normal and tumoral sources are investigated with irradiated substrates, pyruvate or respectively lactate. A peculiar effect is recorded in tumors : the enzyme responds with an initial rate enhancement in the pyruvate ⇒ lactate reaction only, when tested with irradiated pyruvate, and never in the lactate ⇒ pyruvate reaction, when tested with irradiation lactate. This seems to be a new tumor metabolic characteristic with some relevant implications for the tumor control mechanisms.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroşan, P. Murgoci, Bull. Math. Biophysics, **31**, 623 (1969).
2. S. Comoroşan, Nature (London), **227**, 64 (1970).
3. S. Comoroşan, P. Murgoci, D. Şandru, M Cru, Physiol. Chem. Physics, **3**, 343 (1971).
4. S. Comoroşan, P. Murgoci, Bull. Math. Biophysics, **33**, 373 (1971).
5. S. Comoroşan, P. Murgoci, Bull. Biophysics, **33**, 589 (1971).
6. S. Comoroşan, M. Cru, S. Vieru, Enzymologia, **42**, 31 (1972).
7. A. Pesce, T. P. Fondy, F. Stolzenbach, F. Castillo, N. .O Kaplan, J. Biol. Chem., **242**, 2 151 (1967).
8. A. Pesce, R. H. McKay, F. Stolzenbach, R. D. Cahn, N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., **239**, 1753 (1964).
9. O. H. Lowry, N. J. RoseBrough, L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
10. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Şandru, Europ. J. Cancer, **6**, 393 (1970).
11. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Şandru, P. Murgoci, Physiol. Chem. Physics, **3**, 1 (1971).
12. S. Comoroşan. S. Vieru, D. Crişan, D. Sandru, P. Murgoci, E. Alexandrescu, Physiol. Chem. Physics, **3**, 103 (1971).
13. R. L. Sherman, S. T. Sie Bert, W. H. Yee, Physiol. Chim. Physics, **5**, 49 (1973).
14. S. Comoroşan, S. Vieru, P. Murgoci, Biochem. Biophys. Acta, **268**, 620 (1972).
15. Y. Ikehara, K. Inokuchi, H. Endo, Gann, **60**, 449 (1969).
16. F. Shapira, J. C. Dreyfus, G. Shapira, Nature (London), **200**, 995 (1963).

METABOLISMUL HORMONILOR ESTROGENI ÎN FUNCŢIE DE VÎRSTĂ ŞI SUB ACŢIUNEA ACIDULUI N-ACETIL-TIAZOLIDINCARBOXILIC

ELENA MOLDOVEANU*), M. ŞERBAN**)

Rezumat. În ovarul şi în uterul de şobolan se remarcă o scădere a -SH-ului proteic şi neproteic şi o creştere a -S-S- neproteic la animalele bătrîne comparativ cu cele tinere. Enzimele investigate, glucoza-6-fosfatdehidrogenaza şi mevalonatkinaza în ovar şi glucozo-6-fosfatdehidrogenaza şi peroxidaza în uter evidenţiază scăderi ale activităţii enzimatice în funcţie de vîrstă. S-a studiat modificarea acestor parametri în urma tratamentului cu acid-N-acetil-tiazolidinacarboxilic aplicat animalelor bătrîne.

Interacţiunile dintre hormonii estrogeni şi grupările -SH proteice şi neproteice sînt multiple şi complexe. Aceste interaciuni au loc atît la nivelul steroidogenezei, cît şi al mecanismului de stimulare a ţesutului „ţintă" : — uterul.

În procesul de steroidogeneză, două etape comune tuturor organelor steroidoformatoare sînt -SH dependente : reacţia catalizată de mevalonatkinază, enzimă implicată în sinteza squalenului (1) şi reacţiile de 17,20 şi 21 hidroxilare ale colesterolului în care este implicat citocromul P—450, -SH dependent (2, 3, 4, 5).

Acţiunea estrogenilor asupra ţesutului „ţintă" — uterul — este condiţionată de fixarea lor prealabilă pe receptorii celulari specifici care conţin grupări -SH ce participă direct la formarea complexului estrogen-receptor (6, 7).

Pornind de la importanţa grupărilor -SH în metabolismul hormonilor estrogeni şi de la rolul posibil al acestor grupări în procesul de îmbătrînire, ne-am propus să studiem variaţia concentraţiei -SH proteic şi neproteic şi respectiv a -S-S- neproteic în ovarul şi uterul de şobolan, în funcţie de vîrstă. Obiectivul acestor cercetări l-a constituit totodată şi stabilirea unor corelaţii a acestor valori cu activitatea unor enzime din uter, implicate în răspunsul uterin la estrogeni.

În ovarul de şobolan au fost investigate mevalonatkinaza şi glucozo-6-fosfatdehidrogenaza (G_6PDH). Învestigarea acestor enzime s-a bazat pe faptul că mevalonatkinaza este dependentă de prezenţa grupărilor -SH (1), iar NADPH generat în urma reacţiei catalizate de G_6PDH prezintă o importanţă deosebită în formarea scheletului steroid, în clivarea lanţului lateral al colesterolului, în reducerea dublelor legături şi în procesele de hidroxilare, etape esenţiale în biosinteza hormonilor estrogeni (8).

Datele din literatură evidenţiază diferenţieri ale activităţii G_6PDH în funcţie de organ, dezvoltare sexuală, vîrstă şi ciclu estral (8).

În uter s-a urmărit activitatea G_6PDH şi a peroxidazei.

Determinarea activităţii G_6PDH se justifică prin participarea ei la răspunsul uterotrofic la stimulul estrogenilor, prin rolul ei în cadrul şuntului hexozomonofosfat.

Cercetările efectuate asupra modificării acestor parametri în funcţie de vîrstă au fost corelate cu încercarea de corectare a lor sub acţiunea acidului N-acetil-tiazolidincarboxilic, substanţă eliberatoare de grupări -SH active (9, 10).

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 150 şobolani femele de diferite vîrste, grupate în 3 loturi: animale adulte (6—7 luni) în greutate medie de 180 g; animale bătrîne (20—24 luni) în greutate medie de 230 g şi animale bătrîne (20—24 luni) în greutate medie de 230 g tratate cu acid N-acetiltiazolidincarboxilic (acATC) administrat zilnic timp de 21 zile în doză de 5 mg /100 g greutate corporală. Determinarea concentraţiei -SH proteic şi neproteic s-a făcut după metoda descrisă de Sedlak şi Lynsday (11). Determinarea concentraţiei -S-S- neproteic s-a efectuat după o metodă adaptată de noi bazată pe măsurarea absorbţiei la 283 nm a dithiotreitolului oxidat format (12).

Activitatea G_6PDH s-a determinat după metoda descrisă de K. L. Barker şi J. C. Waren (13).

Determinarea activităţii peroxidazice s-a făcut după metoda Bergmayer (14).

Determinarea activităţii mevalonatkinazei s-a efectuat conform metodei descrisă de H. R. Levy şi Popjak (15).

Concentraţia proteică s-a dozat după metoda Lowry, utilizîndu-se drept standard serum albumina bovină (16).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Concentraţia —SH proteic şi neproteic în ovarul de şobolan scade cu vîrsta în mod semnificativ, scăderea cea mai evidentă înregistrînd-o —SH-ul proteic (fig. 1).

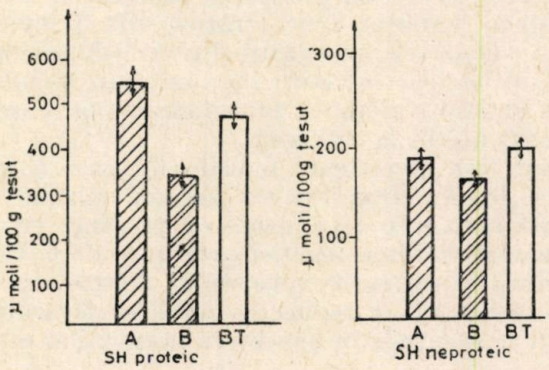


Fig. 1 — Concentraţia —SH proteic şi neproteic în ovarul de şobolan:
A — adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi

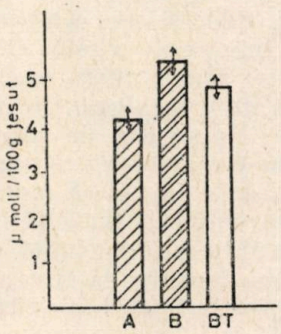


Fig. 2 — Concentraţia -S-S- neproteic în ovarul de şobolan
A — adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi.

Din analiza variației concentrației -S-S- neproteic (care poate fi asimilat cu glutationul oxidat) în funcție de vîrstă, se remarcă creșterea marcantă a concentrației glutationului oxidat la animalele bătrîne (fig. 2), ceea ce corespunde ipotezei conform căreia senescenței îi este caracteristică acumularea de grupări disulfidice.

Cercetările efectuate asupra variației activității mevalonatkinazei evidențiază o scădere a activității acestei enzime la animalele bătrîne comparativ cu cele adulte (tabela 1).

Tabela 1

Valorile medii ale activității mevalonatkinazei în ovarul de șobolan (μ moli NADH ox/min/mg prot.)

Lot	Nr. animal	M	ES ±	P
– adulți	50	5,76	0,34	$< 0,01$
– bătrîni	50	4,23	0,31	$0,01 < P < 0,02$
– bătrîni tratați	50	4,88	0,40	

În același sens variază și activitatea G_6PDH în funcție de vîrstă (tabela 2).

Tabela 2

Valorile medii ale activității G_6PDH în ovarul de șobolan (U/mg proteină/min)

Lot	Nr. animal	M	ES ±	P
– adulți	50	483	21,0	$< 0,01$
– bătrîni	50	421	19,0	$< 0,01$
– bătrîni tratație	50	475	18,5	

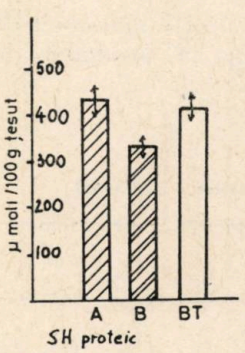
Scăderea activității G_6PDH și a mevalonatkinazei la animalele bătrîne comparativ cu cele tinere este în concordanță cu ritmul scăzut al biosintezei de hormoni estrogeni semnalat la aceste animale și în strînsă corelație cu scăderea concentrației -SH proteic și neproteic.

Perturbările produse în biosinteza hormonilor estrogeni în ovarul animalelor bătrîne se repercutează asupra proceselor metabolice uterine, ca urmare a unui stimul redus exercitat de cantități tot mai reduse de hormoni estrogeni.

În țesutul uterin se remarcă o scădere a valorilor concentrației -SH proteic și neproteic la animalele bătrîne în comparație cu valorile caracteristice animalelor adulte (fig. 3).

Scăderea -SH proteic este în raport cu activitatea scăzută a enzimelor -SH dependente și cu scăderea concentrației receptorilor celulari ai estradiolului. Scăderea -SH neproteic corespunde oxidării glutationului și alterării diverselor sisteme enzimatice în care acesta îndeplinește rolul de coenzimă. Scăderea -SH neproteic este însoțită de o creștere a -S-S- neproteic (exprimată ca glutation oxidat) în uter (fig. 4).

Activitatea G_6PDH şi peroxidazei din uter scade puternic în funcţie de vîrstă şi corespunde stimulului slab exercitat de estrogeni, ca urmare a unei biosinteze ovariene diminuate (Tabela 3) (fig. 5).



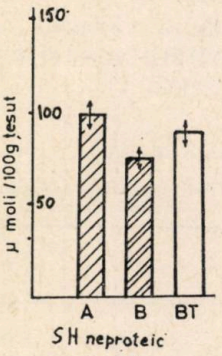


Fig. 2 — Concentraţia -SH proteic şi neproteic în uterul de şobolan
A adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi

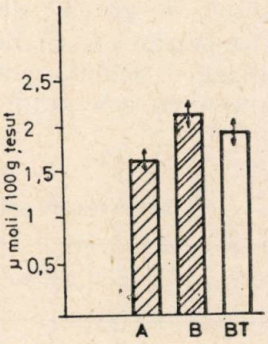


Fig. 4 — Concentraţia -S-S- neproteic în uterul de şobolan
A — adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi .

Tabela 3

Valorile medii ale G_6PDH în uterul de şobolan (U/mg proteină/min)

Lot	Nr. animal	M	ES ±	P
— adulţi	50	270	25	< 0,01
— bătrîni	50	177	30	< 0,01
— bătrîni trataţi	50	222	17	

R. Hilf (17) arată că activitatea G_6PDH în uter creşte în urma administrării de estrogeni şi variază în timpul ciclului, cu o creştere marcantă în timpul estrusului şi sugerează că G_6PDH joacă un rol important în răspunsul uterotrofic la estrogeni. Scăderea activităţii G_6PDH în uterul animalelor bătrîne comparativ cu cele tinere este în concordanţă cu aceste date.

Scăderea activităţii peroxidazei uterine la animalele bătrîne este în deplină concordanţă cu interdependenţa dintre activitatea peroxidazică a ţesutului uterin şi concentraţia estradiolului în acelaşi ţesut (18).

Datele din literatură semnalează absenţa activităţii peroxidazice la animalele imature, bătrîne sau ovariectomizate (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). În cazul animalelor ovariectomizate tratate cu estradiol, activitatea peroxidazică este dependentă de cantitatea de estrogeni administrată (20, 21, 22, 24).

Din figura 5 rezultă că activitatea peroxidazică la animalele adulte este mare, iar la cele bătrîne foarte scăzute. Scăderea activităţii peroxidazei uterine la animalele bătrîne comparativ cu cele tinere este însoţită şi de o scădere accentuată a coenzimei sale, glutationul redus.

C. R. Lyttle (25) sugerează că peroxidaza uterină este implicată în degradarea estradiolului după ce acesta şi-a exercitat rolul său în ţesutul ţintă sau este în exces.

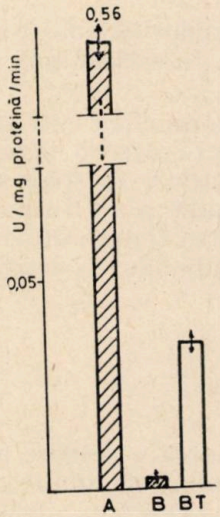


Fig. 5 — Valorile medii ale activităţii peroxidazice în uterul de şobolan
A — adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi.

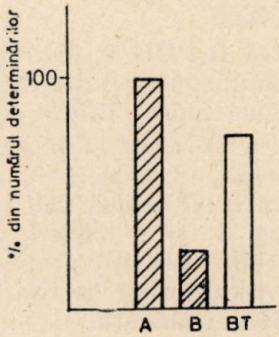


Fig. 6 — Frecvenţa apariţiei activităţii peroxidazice
A — adulţi; *B* — bătrîni; *BT* — bătrîni trataţi.

P. H. Jellinck (22) atribuie peroxidazei uterine un rol important în formarea unui radical liber intermediar capabil să reacţioneze cu o varietate de acceptori.

Indiferent care este rolul peroxidazei uterine, trebuie reţinut că această enzimă este dependentă de nivelul endogen al estrogenilor la animalele normale şi de cantitatea de estrogeni administrată la animalele ovarectomizate.

În figura 6 este prezentată frecvenţa apariţiei activităţii peroxidazice la animalele investigate. La animalele bătrîne această frecvenţă este în proporţie de numai 25% din cea a animalelor tinere.

Administrarea de acATC, substanţă eliberatoare de grupări -SH active, a urmărit corectarea raportului -SH/-S-S- şi a celorlalţi indici investigaţi la animalele bătrîne. Tratamentul produce o anumită creştere a concentraţiei -SH proteic şi neproteic în ovarul şobolanilor bătrîni; valorile -SH neproteic depăşesc în condiţiile de tratament chiar valorile proprii animalelor adulte.

Scăderea concentraţiei -S-S- neproteic se corelează perfect cu creşterea concentraţiei -SH neproteic (fig. 2).

R zultă că în ovarul animalelor bătrîne tratate cu acATC echilibrul -S-S- $\rightleftarrows$ 2 - SH este deplasat în favoarea formării de grupări -SH

libere. Creşterea concentraţiei -SH neproteic conduce la activarea sistemelor enzimatice -SH dependente.

În urma tratamentului cu acATC se restabileşte în ovar activitatea enzimelor -SH dependente, posibil corelată cu o accentuare a biosintezei hormonilor steroizi.

Activitatea G_6PDH în ovarul şobolanilor bătrîni trataţi tinde spre valori proprii animalelor adulte (tabela 2). În acelaşi sens variază şi activitatea mevalonatkinzei tabela 2).

Modificările ce apar în biosinteza hormonilor estrogeni în ovarul animalelor bătrîne se reflectă în parametrii uterini investigaţi. Astfel, acATC produce la animalele bătrîne tratate o creştere a -SH proteic şi neproteic (fig. 3) şi o scădere accentuată a -S-S-neproteic (fig. 4.) Creşterea concentraţiei -SH proteic ar putea fi datorată activării grupărilor -SH ale receptorilor uterini ai estradiolului şi activării sistemelor enzimatice -SH dependente.

CONCLUZII

În ovarul animalelor bătîne se remarcă o scădere a concentraţiei -SH proteic şi neproteic comparativ cu animalele adulte.

Activitatea enzimelor investigate în ovarul de şobolan (glucozo-6--fosfatdehidrogenaza şi mevalonatkinaza) variază în funcţie de vîrstă, la animalele bătrîne înregistrîndu-se o scădere a activităţii enzimatice.

Concentraţia -SH proteic şi neproteic scade în uterul şobolanilor bătrîni. Activitarea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei şi peroxidazei scade la animalele bătrîne comparativ cu cele adulte.

Acidul N-acetil-tiazolidincarboxilic are capacitatea ca prin grupările -SH active eiberate să stimuleze biosinteza hormonilor estrogeni în ovar şi implicit să poată acţiona la nivelul sistemelor enzimatice -SH dependente.

Prezentat la redacţie
la 21 octombrie 1977

*) *Institutul „V. Babeş" Bucureşti*
**) *Institutul Agronomic*
Depart. Chimie
Bucureşti

THE OESTROGEN HORMONES METABOLISM AS A FUNCTION OF AGE AND UNDER THE ACTION OF THE N-ACETYL-TIAZOLIDINCARBOXYLIC ACID

SUMMARY

A decrease of protein and nonprotein - SH, and an increase of nonprotein -S-S- is observed in the rat, ovary and uterus in old animals, as compared with young ones. The enzymes tested ovary, glucose-6-phosphate dehydrogenase and mevalonate kinase, and uterus

peroxidase show decreases in activities, depending on age. The alteration of the mentioned parameters as a result of the treatment with N-acetyl-tiazolidincarboxylic acid was also investigated.

BIBLIOGRAFIE

1. Levy, H. R., Popjac J., Biochem. J. **75**, 417 (1960).
2. Capalna S., Biochimie dinamică. Ed. med. Buc., 1971, p. 114.
3. Boyd G. S., Brownice A. C., Jefcoat C. R., Simpson E. R., Biochem. J. **125**, 1p (1971).
4. Ullrich V., Ruf H. H., Mimoun H., Biochem. J. 125, 90 (1971).
5. Matthijssen C., Goldzieher J. W., Biophys. Acta **60**, 20 (1962).
6. Belpomme M. B., Tries J., Erdos M., Eur. J. Biochem. **17**, 425 (1970).
7. Liang T., Luio S., Biochem. Biophys. Acta **277**, 590 (1972).
8. Hunter F., Hafy G. W., Endokrinologie **54**, 85 (1969).
9. Oeriu I., Timariu S., Petco D., Serban D., Zbl. Vet. Med. A — **17**, 34 (1971).
10. Alessandrescu D., Papanicu V., Doroban-Voicescu E., **XIII**, 353, 1965.
11. Sedlak J., Lynsday R., Analyt. Biochem. **25**, 192 (1968).
12. Lyer K. D., Klee V. A., J. Biochem. **248** 2 (1973).
13. Barker K. L., Waren J. C., Endocrinology **78**, 205 (1966).
14. Bergmeyer H. V., Methoden der Enzymatischen Analyse, Acad. Press Inc. N. Y., 651, 1974.
15. Leyv H. R., Popjac G., Biochem. J. **75**, 417 (1960).
16. Lowry O. H., Reseborough N. Y., Farr A. L., Randall R. J., J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
17. Hilf E. R., McDonald E., Sartini J., Rector W. D., Richards A. H., Endocrinology **91**, 280 (1972).
18. Lyttle C. R., Jellinck P. H., Biochem. J. **160**, 237 (1976).
19. Brokelmann, J., J. Histochem. Cytochem. **17**, 394 (1969).
20. Cavazos F., Lucas F. V., Am. J. Obst. Gynecol. **93**, 7 (1965).
21. Jellinck P. H., Rosemarie Fletcher, Can. J. Biochem. **48**, 1192 (1970).
22. Jellinck P. H., Rosemarie Fletcher, Can. J. Biochem. **49**, 885 (1971).
23. Klebanoff S. J., Endocrinology **76**, 301 (1965).
24. Lucas F. V., Neufeld H.A., Utterbach J. G., Martin A. P., Statz E., J. Biol. Chem., **214**, 2 (1955).
25. Lyttle C. R., Jellinck P. H., Biochemistry J., **127**, 481 (1972).

PRECIPITAREA FRACŢIONATĂ A IgA SECRETOARE UMANĂ

GABRIELA MOŢA

Rezumat. Prin precipitare fracţionată cu sulfat de amoniu între 25—59%, s-au izolat din colostru uman populaţii de molecule de IgA secretoare (sIgA) ce variază prin rezistenţa lor la hidroliza enzimatică. O rezistenţă maximă la hidroliză s-a înregistrat la fracţiunea obţinută prin precipitare între 32—39% $(NH_4)_2SO_4$. Cantitatea cea mai mare de proteină precipitată cît şi procentul cel mai ridicat de sIgA s-a obţinut între 39—46% $(NH_4)_2SO_4$. Concentraţia relativă maximă a subclasei IgA_2 a fost înregistrată la fracţiunea cea mai rezistentă la hidroliză. Se discută constanta de precipitare a subclaselor de IgA.

Imunoglobulinele A umane variază prin greutatea lor moleculară, ele se pot găsi sub formă monomerică, dimerică sau de polimeri superiori (1). Monomerul are o greutate moleculară de 162.000 şi poate da o serie de polimeri de 162.000 × 2, 3, 4 şi 5 în proporţie variabilă, dimerul deţine însă procentul cel mai ridicat. Asocierea dimerului de IgA cu componentul secretor (CS) îi conferă o creştere a greutăţii moleculare în jur de 385.000(2). IgA prezintă două subclase distincte antigenic (3, 4, 5, 6), Ig A1şi IgA2 care se diferenţiază prin tipul de legături existente între lanţurile grele şi uşoare. Subclasa IgA1 prezintă legături disulfidice H—L, iar subclasa IgA2 legături de hidrogen (7). Aceste diferenţe structurale ale subpopulaţiilor de IgA pot determina o comportare diferită a acestor subpopulaţii sub acţiunea unui agent precipitant sau în prezenţa enzimelor proteolitice.

Repartiţia şi proporţia grupărilor polare hidrofile şi a grupărilor apolare hidrofobe la suprafaţa moleculei (8) poate varia în cadrul celor două subclase de IgA care diferă prin modul de asamblare a moleculei. Ca urmare, cele două subpopulaţii de IgA pot avea o constantă de precipitare diferită.

În lucrarea de faţă s-a încercat ca prin precipitare fracţionată cu sulfat de amoniu, să se obţină un amestec de imunoglobuline în care concentraţia relativă IgA1/IgA2 să atingă un procent foarte ridicat pentru una dintre subclase.

MATERIAL ŞI METODE

IgA secretoare (sIgA)a fost obţinută din colostru uman prin precipitare fracţionată cu sulfat de amoniu între 25—59%, în trepte de concentraţie de cîte 7% $(NH_4)_2SO_4$. Imunoglobulina a fost fracţionată pe o coloană de Sephadex G—200 de 120 × 2,5 cm, iar puritatea a fost testată imunoelectroforetic. Cantitatea de imunoglobulină precipitată a fost determinată prin densitatea optică la 280 nm, iar procentul de IgA din imunoglobulina totală a fost determinat prin analiza cantitativă a piscurilor cromatografice.

St. cerc. biochim., 21, (1), 59—62, (1978)

Probele de sIgA obținute între 25—32, 32—39, 39—46, 46—53 și 53—59% $(NH_4)_2SO_4$, au fost supuse la hidroliză. S-a efectuat hidroliza cu papaină 1/100 în tampon fosfat 0,1M pH 5,5 în prezența cistinei — HCl 0,01M și a EDTA-Na_2 0,002M timp de 22 ore la 37°C. Hidrolizatul a fost gel-filtrat iar susceptibilitatea la hidroliză a fost determinată pe baza analizei gravimetrice a piscurilor cromatografice. S-a calculat procentul de sIgA rezistentă la hidroliză în raport cu cantitatea de Fab și peptide eliberate. Pentru aprecierea cantitativă a subclaselor de IgA s-a utilizat electroforeza în poliacrilamidă (PAA) 6% în tampon TRIS-HCl 0,075M, glicocol 0,065 M pH 8,7 cu SDS 0,1%. Preparatele au fost incubate inițial cu SDS 1 % timp de 20 ore la 37°C pentru disocierea legăturilor de hidogen existente între lanțurile H și L ale subclasei IgA_2(9).

REZULTATE

Prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu, cantitatea maximă de proteină s-a obținut între 39—46% $(NH_4)_2SO_4$ (tabela nr. 1), tot la această treaptă de precipitare s-a obținut și procentul maxim de sIgA

Tabela 1

Valorile imunoglobulinei obținută la diferite concentrații ale sulfatului de amoniu

$(NH_4)SO_4$ %	Ig precipitată (mg)	IgA obținută prin gel-filtrare pe Sephadex G—200 (mg)	IgA (%)	IgA nehidrolizată (%)
25	90	15	16,7	12,7
32	94	29	30,8	18,7
39	122	58	47,5	27,8
46	144	95	65,9	26,8
53	138	40	28,9	13,2
59	123	29	23,5	5,9

în raport cu imunoglobulina totală. Nu s-a pus în evidență la preparatele obținute în diferite trepte de precipitare, o concentrație relativă ridicată a unei singure subclase, dar s-a determinat o variație în sensibilitatea lor la enzimă. Rezistența cea mai mare la hidroliza cu papaină, s-a înregistrat la subpopulația de sIgA obținută între 32—39% $(NH_4)_2SO_4$ avînd valori apropiate cu cea obținută între 39—46% (fig. 1). O scădere importantă a

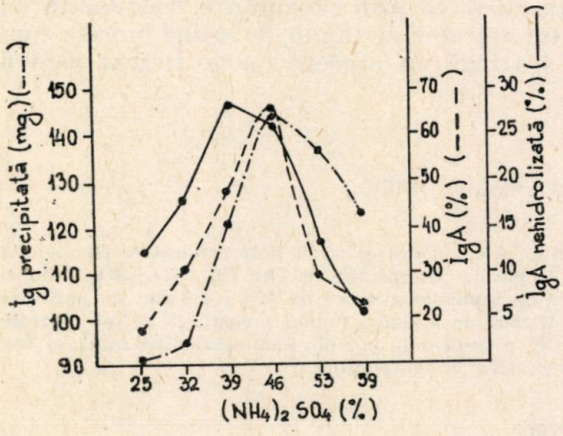


Fig. 1 — Variația rezistenței la hidroliză a sIgA obținută în diferite trepte de concentrație a sulfatului de amoniu

—·— Ig precipitată (mg); — — — IgA purificată %); —— IgA rezistentă la enzimă (%)

rezistenței la hidroliză s-a înregistrat la fracțiunile precipitate cu concentrații scăzute sau foarte ridicate ale sulfatului de amoniu, pînă la 25% și între 53—59% (tabela 1).

Astfel metoda precipitării fracționate cu sulfat de amoniu permite izolarea unor populații de molecule a căror rezistență la hidroliza enzimatică variază. Efectuînd analiza subclaselor de IgA prin electroforeză în PAA 6% cu SDS 0,1%, a probelor de sIgA rezistentă la hidroliză, s-a constatat că procentul cel mai ridicat al subclasei IgA2, în jur de 90%, a fost determinat în preparatul obținut prin precipitare între 32—39% $(NH_4)_2SO_4$.

Aceste rezultate evidențiază clar că rezistența maximă la hidroliză a IgA secretoare umane, se suprapune peste concentrația relativă maximă a subclasei IgA2.

DISCUȚII

Constanta de precipitare a subclaselor de IgA nu înregistrează o diferență care să permită separarea celor două subpopulații de molecule prin metoda precipitării fracționate. Totuși ea permite obținerea unor preparate de imunoglobulină cu o rezistență crescută la acțiunea enzimelor proteolitice, și constituie astfel o primă etapă obligatorie în separarea subclaselor de IgA.

Prin faptul că subclasa IgA2, rezistentă la enzimă, s-a obținut din fracțiunea precipitată la concentrații medii a sulfatului de amoniu (32—39%), iar la concentrații foarte mici sau ridicate s-a obținut sIgA sensibilă la enzimă, se poate considera că la o putere ionică scăzută precipită un procent mare de molecule alterate, care datorită unei transconformări sterice sînt mai sensibile la hidroliza enzimatică, iar la o putere ionică mai ridicată (peste 40% sulfat de amoniu) precipită într-un procent mai mare subclasa IgA1. Se poate deduce că cele două subclase de IgA au constanta de precipitare ușor diferită și că ordinea lor este crescătoare IgA2—IgA1.

Este posibil ca diferențele structurale ale subclaselor de IgA să fie accentuate prin dimerizare și prin complexare cu CS.

Mulțumiri: Aduc mulțumiri pe această cale colegei Mariana Caralicea pentru asistența tehnică de calitate.

Prezentat la redacție
la 20 septembrie 1977

Institutul „Victor Babeș"
Departamentul de Imunologie
Spl. Independenței, nr. 99—101
76 201 — București, 35
ROMÂNIA

STEPWISE PRECIPITATION OF HUMAN SECRETORY IgA

SUMMARY

Molecular populations of secretory IgA (sIgA), which differ by their resistance to enzymatic hydrolysis were isolated from human colostrum, by stepwise precipitation with 25—50% ammonium sulphate.

The fraction obtained with 32—39% ammonium sulphate exhibited the highest resistance to hydrolysis. Both maximum amount of precipitated protein and of sIgA percent were obtained with 39—46% ammonium sulphate. The highest relative concentration of IgA2 subclass was shown to be present in the fraction more resistant to proteolysis. The precipitation constant of IgA subclasses is discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. T. B. Tomasi, E. M. Tan, A. Solomon, R. A. Rpendergast, J. Exp. Med., **121**, 101 (1965).
2. J. P. Vaerman, Annales d'Immunologie (Inst. Pasteur) **124c**, 289 (1973).
3. A. Fenstein E. C. Franclin, Nature (Lond) **212**, 1496 (1966).
5. J. P. Vaerman, J. F. Heremans, Science, **153**, 647 (1966).
6. W. D. Terry, M. S. Roberts, Science, **153**, 1007 (1966).
7. H. M. Grey, C. A. Abel, W. Y. Yount, H. G. Kunkel, J. Exp. Med., **128**, 1 223 (1968).
8. V. Gheție, V. Micușan, Analiza Imunochimică, Ed. Acad. RSR, București (1966).
9. G. Moța, Rev. Roumaine Biochim. **14**, 39 (1977).

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTELE SUPERIOARE X. PIGMENŢII CAROTENOIDICI ŞI CLOROFILIENI DIN PLANTE SUPERIOARE ACVATICE

GAVRIL NEAMŢU, GHEORGHE ILLYES

Rezumat. S-au determinat pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din 16 specii de plante superioare acvatice.
Plantele cercetate conţin în frunze pigmenţi carotenoidici şi clorofilieni similari cu cei existenţi în frunzele plantelor superioare terestre. Plantele din genul *Potamogeton* conţin ca pigment caracteristic rodoxantina.
Raportul dintre conţinutul β-carotinei şi al luteinei din frunzele plantelor superioare acvatice este supraunitar, ceea ce poate constitui un criteriu chemotaxonomic pentru acest grup de plante.
Raportul dintre conţinutul clorofilei a şi b din frunzele plantelor cercetate este cuprins între 4,5 şi 5,4, fiind mai mare decît în frunzele plantelor terestre.

Plantele superioare acvatice reprezintă un grup ecologic care are o importanţă însemnată pentru viaţa animalelor acvatice. Ele servesc ca hrană pentru numeroase animale ce trăiesc în ape dulci şi sărate şi contribuie într-o proporţie însemnată la oxigenarea şi depoluarea apelor (1).

Plantele acvatice reprezintă elementul biologic fundamental pentru economia apelor, pentru creşterea şi dezvoltarea faunei acvatice. Ele contribuie la transformarea apelor în „ogoare lichide". Unele plante acvatice servesc ca materii prime pentru industria chimică, industria farmaceutică, industria alimentară etc. (1, 2).

Plantele superioare acvatice cu toate că sînt relativ numeroase şi variate sub aspect taxonomic, sînt foarte puţin cercetate sub aspectul compoziţiei chimice. Nu s-a intreprins pînă în prezent un studiu chemotaxonomic asupra pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din aceste plante. Determinarea conţinutului diferiţilor compuşi chimici din plantele superioare acvatice se impune ca o cerinţă majoră pentru a se putea realiza valorificarea superioară a acestor plante.

În această lucrare se prezintă felul şi conţinutul pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din 16 specii de plante superioare acvatice, din diferite genuri şi familii de plante.

MATERIAL ŞI METODE

Plantele cercetate au fost recoltate din serele şi lacurile Grădinii botanice a Universităţii Babeş-Bolyai din Cluj-Napoca, în perioada 1975—1977.

Pentru cercetarea pigmenţilor carotenoidici şi a celor clorofilieni s-au folosit frunze recoltate în lunile iunie şi septembrie din anii menţionaţi.

St. cerc. biochim., 21, (1), p. 63—67, (1978)

Extragerea pigmenților s-a făcut cu acetonă pînă ce extractul a rămas incolor. Din extractul acetonic pigmenții au fost transferați în eter de petrol.

Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și nisp fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Coloanele cromatografice s-au developat cu un amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în raport de 6 : 2 : 2. Pentru identificarea și dozarea pigmenților s-a folosit și cromatografia în strat subțire, folosindu-se ca adsorbant oxid de magneziu, iar ca developant amestec de eter de petrol-cloroform-alcool etilic, în raport de 30 : 2 : 1.

Identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-a făcut prin metode cromatografice, spectroscopice și colorimetrice, la fel ca și în lucrările anterioare (3, 4, 5). Pigmenții clorofilieni s-au determinat după metoda prezentată de I. Maróti și Eva Gabnai (6).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici din frunzele plantelor superioare acvatice se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul pigmenților carotenoidici din frunzele plantelor superioare acvatice, în μg/g material uscat

Specia	α-Caro-tina	β-Caro-tina	Cripto-xan-tina	Lute-ina	Zea-xan-tina	Viola-xan-tina	Neo-xan tina	Rodo-xantina
Ambuila rigida	—	60	15	40	12	14	8	—
Ceratopteris thalictroides	5	130	12	98	—	27	11	—
Cabomba aquatica	20	88	4	76	—	32	15	—
Comarum palustre	—	67	18	55	—	16	13	—
Elodea canadensis	—	90	16	78	36	20	16	—
Hidrilla verticillata	—	54	8	45	12	16	10	—
Liumnophylla heterophylla	15	64	10	58	—	23	12	—
Myriophyllum spicatum	9	94	12	69	—	31	12	—
Nimphae alba	4	52	6	38	4	26	14	—
Nimphae lutea	7	73	5	67	7	28	15	—
Najas fragilis	6	94	7	76	—	17	11	—
Potamogeton acutifolius	—	84	8	72	—	23	18	72
Potamogeton crispus	—	64	9	57	—	24	7	58
Potamogeton natans	—	72	14	54	—	27	10	64
Valisneria gigantea	32	102	18	89	10	35	14	—
Valisneria spiralis	30	96	20	83	15	28	8	—

Plantele cercetate, cu excepția celor din genul *Potamogeton*, conțin pigmenți carotenoidici similari cu cei existenți în frunzele plantelor superioare terestre (7, 8. 9, 10). Deosebirile care apar între carotenoidele foliare ale acestor grupe de plante se referă în principal la raportul dintre conținutul luteinei și al β-carotinei — care sînt principalele carotenoide foliare — și la existența unor carotenoide specifice și caracteristice diferitelor genuri și specii de plante. Astfel, în frunzele plantelor acvatice cercetate, în toate speciile, s-a identificat ca pigment principal β-carotina, în timp ce în frunzele plantelor superioare terestre pigmentul principal îl constituie luteina (10, 11, 12). Datorită conținutului relativ ridicat în β-carotină (principala carotenoidă provitaminică A), plantele superioare acvatice au o valoare alimentară însemnată, putînd fi utilizate în hrana omului și a animalelor terestre, ca importante surse de provitamine A.

Conținutul ridicat al β-carotinei din plantele acvatice contribuie cu siguranță la creșterea conținutului vitaminei A în corpul animalelor acvatice, care consumă hrană vegetală.

Raportul dintre conținutul β-carotinei și al luteinei este supraunitar în frunzele plantelor superioare acvatice cercetate și subunitar la cele terestre, ceea ce poate reprezenta o trăsătură caracteristică, cu importanță chemotaxonomică.

Dintre carotenoidele existente în toate speciile cercetate menționăm β-carotina, luteina, criptoxantina, violaxantina și neoxantina. Alături de aceste carotenoide în unele specii se mai găsesc α-carotina și zeaxantina, iar în speciile genului *Potamogeton* s-a identificat în frunze în cantitate relativ mare, rodoxantina. Pentru genul *Potamogeton* rodoxantina reprezintă un pigment principal, caracteristic, cu importanță chemotaxonomică. Rodoxantina nu s-a identificat pînă în prezent în frunzele plantelor superioare terestre decît numai în fructele de *Taxus baccata*, în ciupeci și unele păsări (12, 13).

Plantele superioare acvatice se deosebesc sub aspectul pigmenților carotenoidici și de plantele inferioare acvatice, în mod deosebit de alge (5, 11, 12, 13). În timp ce în plantele superioare acvatice zeaxantina se află în cantitate relativ mică și s-a identificat într-un număr redus de specii, în plantele inferioare acvatice zeaxantina se află în numeroase specii, în cantitate relativ mare, reprezentînd la unele specii xantofila principală (5, 13).

După structura moleculară carotenoidele identificate în plantele superioare acvatice pot fi grupate în următoarele patru categorii :

— Carotenoide hidrocarburice (α și β-carotina)
— Xantofile (criptoxantina, luteina, zeaxantina)
— Carotenoide epoxidice (violaxantina, neoxantina)
— Ceto-carotenoide (rodoxantina).

În plantele cercetate s-au identificat numai carotenoide cu structură α și β-ionică. Nu s-au identificat carotenoide cu structură aciclică sau pseudoiononică. De asemenea nu s-au identificat furanoizi și nici eloxantina, care se află în frunzele unor plante superioare terestre (14).

Conținutul pigmenților clorofilieni se prezintă în tabela 2.

Plantele cercetate au un conținut ridicat în pigmenți clorofilieni. Dintre aceștia s-au identificat clorofila *a*, care reprezintă pigmentul principal, clorofila *b*, feofitine *a* și *b* și clorofilide. Este posibil ca feofitinele și clorofilidele să se formeze parțial în timpul extragerii clorofilelor. Nu s-au identificat clorofilele *c* și *d*, care apar în unele plante inferioare acvatice (15).

La pantele superioare acvatice raportul dintre conținutul clorofilei a și b este mai mare decît la plantele terestre, ceea ce poate constitui de asemenea un criteriu chemotaxonomic. Raportul dintre conținutul clorofilei *a* și *b* la plantele cercetate este cuprins între 4,5 și 5,4 iar în frun-

zele plantelor terstre cercetate pînă în prezent acest raport este cuprins între 2,3 și 3,7 (8, 15, 16, 17).

Între pigmenții carotenoidici și clorofilieni identificați în frunzele plantelor superioare acvatice recoltate în lunile mai și septembrie nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.

Tabela 2

Conținutul pigmenților clorofilieni din frunzele plantelor superioare acvatice, în μg/g material uscat

Specie	Clorofile		Feofitine		Clorofilide	Raportul dintre conținutul clorofilei *a* și *b*
	a	*b*	*a*	*b*		
Ambuila rigida	220	48	17	13	15	4,5
Ceratopteris thalictroides	960	187	18	8	45	5,1
Cabomba aquatica	802	165	64	16	23	4,8
Cabomba palustre	346	68	15	12	23	5,0
Elodea canadensis	436	84	22	10	20	5,1
Hidrilla verticillata	266	53	14	15	15	5,0
Limnophylla heterophylla	976	192	75	16	40	5,0
Myriophyllum spicatum	750	150	60	15	21	5,0
Nymphae alba	348	65	25	13	15	5,3
Nymphae lutea	370	80	23	13	15	4,6
Najas fragilis	350	76	20	8	15	4,6
Potamogeton acutifolius	550	110	44	12	16	5,0
Potamogeton crispus	590	130	15	7	12	4,5
Potamogeton natans	520	104	45	6	15	5,0
Valisneria giganteea	435	86	32	15	31	5,0
Valisneria spiralis	355	65	15	8	25	5,4

CONCLUZII

Plantele superioare acvatice conțin în frunze carotenoide cu structură α și β-ionică. Pigmentul principal este β-carotina alături de care s-au identificat în toate speciile luteina, criptoxantina, violaxantina și neoxantina. În unele plante s-au mai identificat α-carotina, zeaxantina și rodoxantina.

Raportul dintre conținutul β-carotinei și al luteinei este supraunitar diferit de cel din frunzele plantelor superioare terestre, fapt ce poate constitui un criteriu chemotaxonomic.

Dintre pigmenții clorofilieni s-au identificat clorofila *a*, clorofila *b*, feofitine *a* și *b* și clorofilide. Raportul dintre conținutul clorofilei *a* și *b* este mai mare la plantele acvatice decît la cele terestre, fapt ce poate constitui de asemenea un criteriu chemotaxonomic.

Prezentat la redacție
la 22 octombrie 1977

Institutul Agronomic
„Dr. Petru Groza" — Cluj-Napoca
Facultatea de Agronomie

CHEMOTAXONOMIC RESEARCHE IN HIGHER PLANTS X. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENT IN AQUATIC HIGHER PLANTS

SUMMARY

Carotenoid and chlorophyll pigments were determined in 16 species of aquatic higher plants. The leaves of the investigated plants contained carothenoid and chlorophyll pigments similar of those of terrestrial higher plants. The plants of the genus *Potamogeton* contained rodoxanthin as a characteristic pigment.

The ratio between the content of β-carotene and of lutein from the leaves of the aquatic higher plants was supraunitary, a feature that might be used as a chemotaxonomic criterion for this group of plants.

The ratio between the content of chlorophyll *a* and *b* from the leaves of the investigated plants varied between 4.5 and 5.4 and it was higher than that in the leaves of terrestrial higher plants.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Antonescu, *Plante de apă şi de mlaştină*, Editura de Stat pentru literatură ştiinţifică şi didactică, 1951, p. 7.
2. Cr. Simionescu, V. Rusan, V. Popa, *Chimia algelor marine*, Edit. Acad. R.S.R. Bucureşti, 1974, p. 62.
3. Gh. Illyes, G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **18**, 109 (1975).
4. G. Neamţu, C. Bilaus, T. Laszlo, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
5. G. Neamţu, E. Kocsis, M. T. Gomoiu, St. cerc. biochim. **20**, 187 (1977).
6. I. Maróti, E. Gabnai, Acta Biol. Szeged., **17**, 67 (1971).
7. C. Costes, Ann. Physiol. Vég., 9, 157 (1967).
8. C. Costes, Ann. Physiol. Vég., **10**, 171 (1968).
9. H. H. Strain, Citat din *Biochemistry of Chloroplasts* (Ed. T. W. Goodwin) Vol. I, Acad. Press. London and New York, 1966, p. 387.
10. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **17**, 41 (1974).
11. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press London and New York, 1965, p. 127.
12. B.C.L. Weedon, Carotenoids (Ed. O. Isler), Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgard, 1971, p. 37.
13. T. W. Goodwin, *Comparative Phytochemistry* (Ed. T. Swain), Acad. Press London and New York, 1966, p. 121, 127, 128.
14. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **14**, 419 (1971).
15. A. S. Holt, citat din *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Ed. T. W. Goodwin) Acad. Press. London and New York, 1965, p. 3.
16. C. Bodea, V. Fărcăşan, E. Nicoară, H. Sluşanschi, *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I, Ed. Acad. R.S.R., 1964, p. 522.
17. G. Neamţu, T. Laszlo, C. Bilaus, Gh. Illyes, St. cerc. biochim., **19**, 81 (1976).

CARACTERIZAREA PROTEINELOR EXTRASE DIN NĂMOLURILE ACTIVE NORMALE ŞI INTOXICATE CU p-NITRO-ANILINĂ

SANDA RĂDULESCU, ECATERINA ILICA, ZINA MOLDOVEANU

Rezumat. S-au studiat proteinele extrase din nămoluri active normale şi nămoluri active intoxicate cu p-nitroanilină, prin electroforeza discontinuă în SDS, în prezenţă de uree.
Modificările sensibile ale proteinelor şi glicoproteinelor, evidenţiate electroforetic, pot fi un indiciu al stării de intoxicare a nămolului activ.

Este recunoscută importanţa stării nămolurilor active în staţiile de epurarea biologică a apelor provenite din diferite industrii.

Plecînd de la ideea că proteinele celulare ale microorganismelor dintr-un nămol activ, sînt substanţe extrem de sensibile la schimbările de mediu şi hrană (1), am presupus că modificările care apar în proprietăţile lor fizico-chimice pot servi ca un indicator al stării de intoxicare.

Am ales electroforeza discontinuă în SDS, în prezenţa de uree, datorită unei bune rezoluţii a proteinelor.

MATERIAL ŞI METODE

1. *Extracţia proteinelor* din nămolurile active s-a realizat în două moduri : prin ultrasonare şi prin moara coloidală.

a) *Extracţia proteinelor prin ultrasonare* (2) s-a făcut cu aparatul M.S.E. astfel : 10 ml de suspensie nămol activ s-au centrifugat la 6000 rpm, timp de 20 min. Depozitul care în medie a cîntărit 0,4 g s-a reluat în 4 ml tampon TRIS—HCl 0,02 M, NaCl 0,2 M, pH 8,0, cu 2% deoxicolat de sodiu (DOC). Suspensia s-a ultrasonat de 4 ori, cîte 1 min, la rece şi apoi s-a centrifugat 20 min. la 10 000 rpm. Supernatantul reprezintă *extractul ultrasonat.*

b) *Extracţia proteinelor prin moara coloidală* s-a realizat în laboratorul de la I.C.P.G.A. astfel : Suspensia de nămol activ s-a centrifugat timp de 30 min la 6 000 rpm. S-au luat 5g depozit umed şi s-a spălat de două ori cu ser fiziologic prin centrifugare la 6 000 rpm, timp de 10 min. Depozitul rezultat s-a suspendat în 10 ml tampon TRIS — HCl 0,05 M pH 8,5, cu 2% DOC şi s-a introdus timp de 60 min în moara coloidală. Suspensia s-a congelat apoi pînă a doua zi, s-a dezgheţat şi s-a centrifugat 30 min la 6 000 rpm. Supernatantul reprezintă *extractul din moara coloidală.*

2. *Disc electroforeza în mediu de acid acetic* s-a realizat după metoda lui Takayama (3).

Pentru solubilizarea proteinelor din extractele şi depozitele nămolurilor active obţinute prin metodele amintite mai sus s-au folosit : extracţia proteică acidă şi extracţia proteică cu lizozim.

a) *Extracţia proteică acidă* s-a realizat cu o soluţie extractantă formată din două părţi fenol, o parte acid acetic glacial, apă şi 4 M uree. Probei de solubilizat i s-a adăugat soluţia extractantă şi apă, astfel încît concentraţia proteică finală a fost de 10 mg/ml. Solubilizarea s-a realizat prin incubare la 37°C timp de 60 min.

b) *Extracţia proteică cu lizozim* (4). Depozitul, bogat în membrane celulare, cu greutate umedă de 250 mg s-a suspendat în 1 ml tampon TRIS 0,1 M, pH 7, 6, cu 0,25 M zaharoză şi s-a adăugat 1,25 mg lizozim. A urmat o incubare de o oră la 37°C pentru extracţia proteinelor membranelor celulare.

Gelurile necesare electroforezei discontinue s-au obţinut prin incubarea timp de 15 min la 50°C a soluţiei de 7,5% poliacrilamidă cu 35% acid acetic glacial, 5 M uree, turnată în tubuşoare şi acoperită cu 75% acid acetic. Probele aplicate au avut un volum de 10—15 µl. Migrarea electroforetică s-a realizat în mediu de acid acetic 10% timp de o oră cu 5 mA/tub.

3. *Disc electroforeza în sodiu dodecilsulfat* s-a realizat după metoda lui Weber şi Osborn (5) Solubilizarea proteinelor din extracte şi depozite s-a realizat prin incubarea probelor la 37°C timp de 2 ore, în tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0, 1% SDS şi 1% β-mercaptoetanol în prezenţa 5 M uree sau 8 M uree. Probele astfel solubilizate s-au folosit pentru disc electroforeza în gel de poliacrilamidă 10% în tampon fosfat pH 7,8, cu 0,2% SDS, persulfat de amoniu 15 mg/ml, TEMED 0,13 ml%. Tamponul de cuvă a fost fosfat pH 7,8 (7,8g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ + 38g $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$)/1 000 ml şi 0,2 g% SDS, diluat 1/1.

Migrarea s-a făcut spre anod timp de 4 ore folosindu-se 8 mA/tub la 200 V.

4. *Colorarea proteinelor* s-a realizat în mod diferit pentru cele două metode de separare electroforetică.

a) Colorarea pentru disc electroforeza în mediu acid s-a realizat cu o soluţie de amido-black 1% în acid acetic 7% timp de o oră. Îndepărtarea excesului de colorant s-a făcut cu acid acetic 7%.

b) Colorarea pentru disc electroforeza în SDS s-a realizat cu o soluţie de Coomassie brillant blue (1,25 g colorant în 454 ml metanol 50% şi 46 ml acid acetic glacial) timp de 5 ore. Decolorarea gelurilor s-a făcut cu o soluţie de 75 ml acid acetic, 50 ml metanol şi 575 ml apă distilată.

5. *Colorarea glicoproteinelor* în ambele metode de separare s-a făcut cu reactivi specifici (6) (7).

6. *Determinarea concentraţiilor proteice* ale extractelor s-a realizat prin metoda Lowry(8) cu întrebuinţarea unei curbe standard trasată cu albumină serică bovină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-a lucrat cu probe de nămol activ neintoxicat (martor), intoxicat 24 ore cu p-nitro-anilină, intoxicat 6 zile şi intoxicat 20 de zile.

Din nămolul martor şi cel intoxicat 24 ore şi respectiv 6 zile proteinele s-au extras prin ultrasonare. Din nămolul intoxicat 20 zile, proteinele s-au extras cu moara coloidală, realizîndu-se totodată şi un martor de nămol neintoxicat, cu proteine extrase prin aceiaşi metodă.

Pentru fiecare tip de nămol (martor şi intoxicat) s-a lucrat pe cîte două probe : extract proteic şi depozit insolubil.

Pentru caracterizarea proteinelor extrase din nămoluri, iniţial am procedat la electroforeza discontinuă în mediu alcalin(9). Am constatat că extractele proteice nu pătrund în porii gelului, că proteinele extrase au greutăţi moleculare foarte mari.

Greutatea moleculară foarte mare a extractului proteic şi proasta rezoluţie în gel de poliacrilamidă, ne-a sugerat posibilitatea întrebuinţării electroforezei discontinue în SDS sau în acid acetic, datorită posibilităţii acestor două metode de a solubiliza proteinele insolubile în mod curent. Aceste metode au fost folosite pentru caracterizarea proteinelor de membrană şi a pereţilor celulari ale diferitelor organisme celulare ca Rhodopseudomonas spheroides (4) sau a membranelor externe celulare de E. coli (10), precum şi a sistemelor citocromice din membrana internă mitocondrială (3) (11).

Ca şi în cazul proteinelor din membrana externă de E. coli, metoda Takayama de separare a proteinelor în acid acetic după solubilizare în fenol-acid acetic-apă, nu a dat o rezoluţie bună nici pentru proteinele extrase şi nici pentru depozitele corespunzătoare. Nici întrebuinţarea

lizozimului ca agent de liză a membranelor celulare din depozite (4) nu a îmbunătăţit rezoluţia electroforetică.

Electroforeza discontinuă în SDS a extractelor şi depozitelor nămolurilor active a dat o rezoluţie bună pentru proteine deoarece mediul de incubare a proteinelor pentru solubilizarea lor conţine pe lîngă 1% SDS şi 1% β-mercaptoetanol şi uree.

Concentraţia ureei în geluri iniţial a fost de 5M, dar datorită faptului că pentru depozite nu am obţinut o rezoluţie bună am repetat disc electroforeza cu 8 M uree. Rezoluţiile proteice pentru depozite au fost cu mult mai bune.

În figurile 1 şi 2 sînt date rezultatele obţinute la disc electroforeza în SDS cu 5M uree şi respectiv 8 M uree.

Dacă comparăm extractele cu depozitele corespunzătoare de la nămolurile normale şi intoxicate (fig. 2, *7* cu *11* şi *8* cu *12*) constatăm că extractul este o reflectare a depozitului atît pentru proteine cît şi pentru glucide.

Dacă comparăm extractele nămolului normal iniţial şi după 6 zile de intoxicare (fig. 1, *1* şi *2*) nu constatăm nici o diferenţă, deoarece acestea prezintă aceeaşi rezoluţie : două benzi lîngă start, bine colorate şi alte două benzi, una mai slabă şi una foarte puternică la aproximativ 2 cm de migrare.

Extractul nămolului normal la moara coloidală (fig. 1, *3*) prezintă o rezoluţie mult mai slabă, dar prezintă sub banda intensă care corespunde probabil aceleia de la 2 cm din gelurile *1* şi *2* din figura 1, o bandă subţire care colorată pentru glucide arată o colorare foarte puternică, care apare şi la 8 M uree (fig. 2, *9*). Această bandă proteică apare şi la nămolul normal la 8 M uree (fig. 2, *7*).

Comparînd nămolurile normale cu cele intoxicate, respectiv *1* cu *4* (fig. 1) sau *7* cu *8* (fig. 2), pentru 24 ore intoxicare, *2* cu *5* (fig. 1), pentru 6 zile intoxicare, *3* cu *6* (fig. 1) şi *9* cu *10* (fig. 2), pentru 20 zile intoxicare, se constată la 24 ore apariţia unei benzi proteice foarte intense în plus, bandă care nu mai apare la extractele nămolurilor intoxicate 6, sau 20 zile.

La extractul cu moara coloidală constatăm, la glucide, la intoxicarea de 20 zile, apariţia unei benzi de viteză mare de migrare absentă atît la martor (fig. 1, *3* şi *6*) cît şi la intoxicarea de 24 ore (fig. *2*, *8* cu *7* şi *12* cu *11*). Se mai constată dispariţia benzii cu viteză mică de migrare prezentă la martor.

Din rezultatele prezentate mai sus putem spune că metoda Weber şi Osborn de rezoluţie electroforetică în SDS poate indica modificări la nivelul proteinelor şi glicoproteinelor din nămol la diferite stadii de intoxicare. Astfel, se constată o modificare esenţială în primele 24 de ore la proteine, care revine spre normal la intoxicări prelungite. Glicoproteinele suferă modificări progresive în intoxicare, ajungînd la o modificare puternică la intoxicări prelungite.

Modificarea proteică de la 24 ore se corelează cu activarea puternică a proteazelor alcaline din aceleaşi nămoluri (1).

Modificările progresive ale glicoproteinelor spre apariţia unei benzi glucidice puternice la 20 zile intoxicare se corelează cu scăderea lentă a activităţii proteazelor acide ale aceloraşi nămoluri (1).

După modificările mari de al începutul stării de intoxicare, nămolul se reechilibrează, intoxicarea prelungită ducînd la modificări mici care se cumulează spre apariţia unor modificări a glicoproteinelor, care este ştiut că sînt proteine mai rezistente la modificările metabolice.

CONCLUZII

În concluzie putem spune că dacă modificările proteinelor care apar la electroforeza discontinuă în SDS pot fi un indiciu al stării de început a intoxicării, modificările glicoproteinelor pot fi un indiciu al intoxicării lente pînă la intoxicarea totală.

Predat la redacţie
la 20 decembrie 1977

Institutul de ştiinţe Biologice
Colectivul de proteine

PROTEIN CHARACTERIZATION OF NORMAL AND p-NITRO-ANILINE INTOXICATED ACTIVE SLUDGES

SUMMARY

Normal and p-nitro-aniline intoxicated active sludges were tested in terms of their proteins by disc electrophoresis in SDS and ureea.

The sensible alterations in electrophoretic pattern of proteins and glicoproteins, may be regarded as an index for the intoxication or regeneration state of an active sludge.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Ilica, Z. Moldoveanu, C. Motaş, St. cerc. biochim., **20**, *31* (1977).
2. Z. Moldoveanu, E. Ilica, S. Rădulescu, St. cerc. biochim., **20**, *51* (1977).
3. K. Takayama, H. D. Mac Lennan, A. Tzagoloff, C. D. Stoner, Arch. Biochem. Biophys., **114**, *223* (1966).
4. J. W. Huang, S. Kaplan, Biochim. Biophys. Acta, **307**, *301* (1973).
5. K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., **244**, *4406* (1969).
6. H. R. Maurer, *Disk-electrophorese*, Berlin, 1968, p. 71.
7. J. W. Keyser, Annal. Biochem., **9**, *249* (1964).
8. C. H. Lowry, N. J. Rosenbraugh, L. A. Farr, J. Biol. Chem., **193**, *265* (1951).
9. R. A. Reisfeld, P. A. Small, Science, **151**, *1253* (1966).
10. J. Sekizava, S. Fukui, Biochem. Biophys. Acta, **307**, *104* (1973).
11. J. D. Hall, F. L. Crane, Biochem. Biophys. Acta, **225**, *602* (1972).

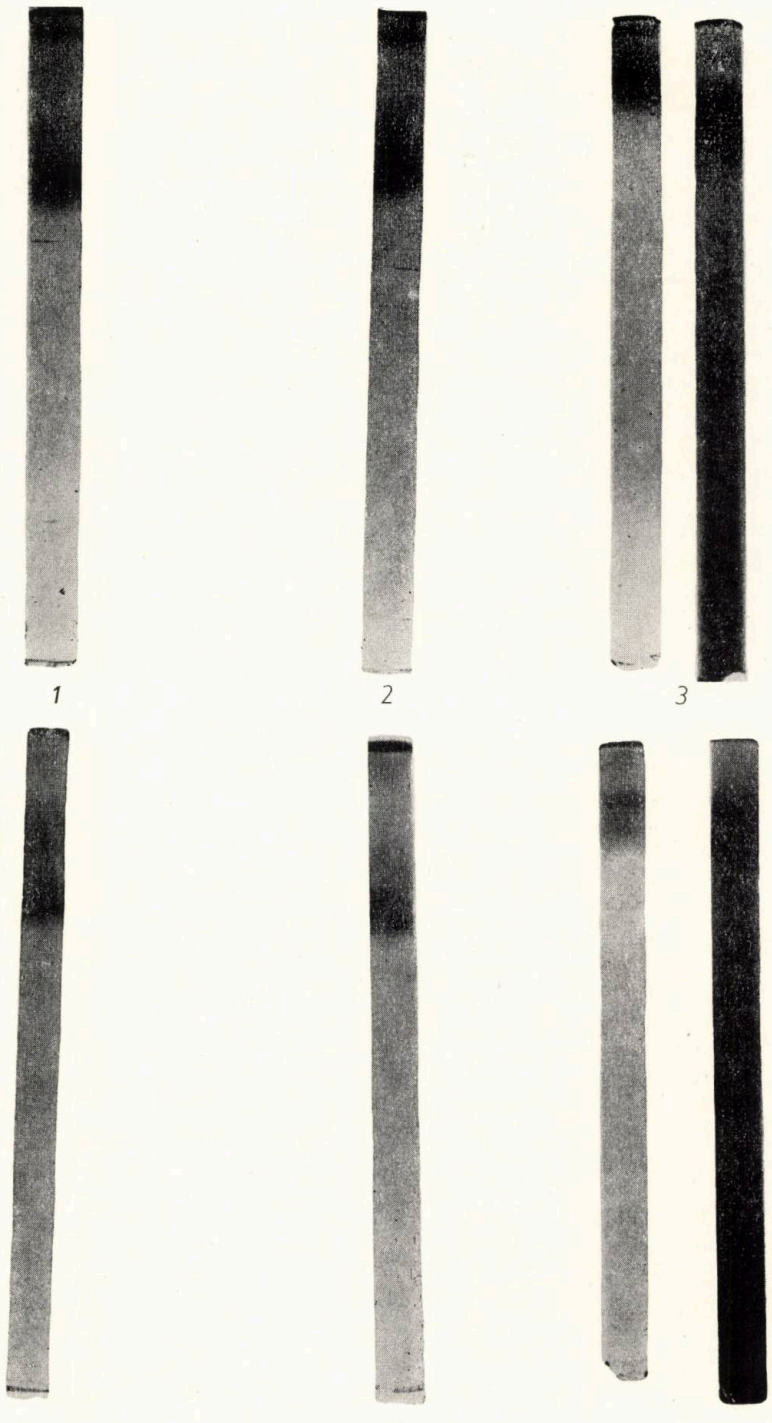


Fig. 1 — Disc electroforeza în prezență de 5 M uree a extractelor de nămol normal și intoxicat

1. Extract de nămol normal; 2. Extract de nămol normal după 6 zile; 3. Extract de nămol normal după 20 zile (moară coloidală); 4. Extract de nămol intoxicat 24 ore; 5. Extract de nămol intoxicat 6 zile; 6. Extract de nămol intoxicat 20 zile (moară coloidală).

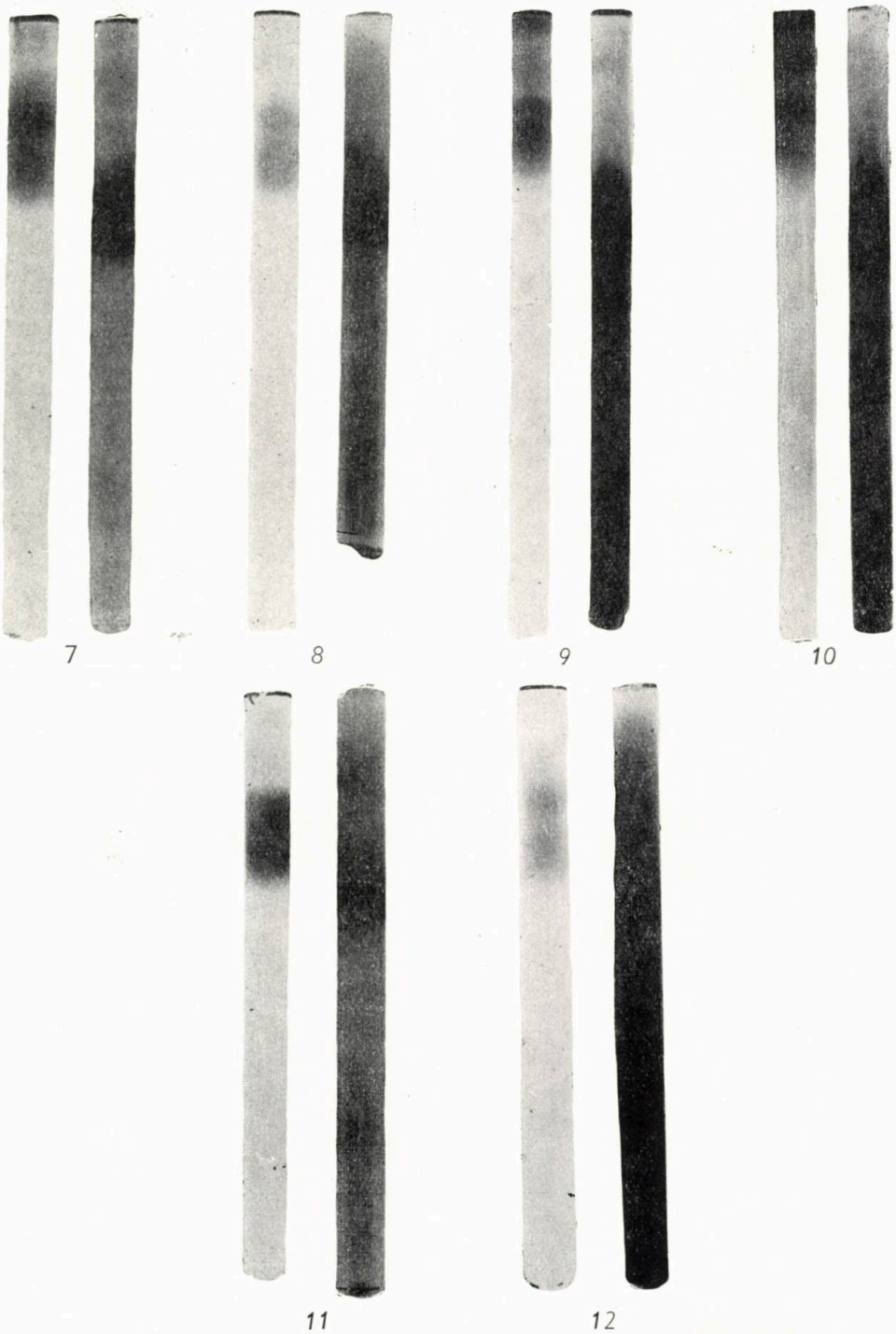


Fig. 2—Disc electroforeza în prezenţă de 8M uree a extractului şi depozitului de nămol normal şi intoxicat

7. Extract nămol normal ; 8. Extract nămol intoxicat 24 ore ; 9. Extract nămol normal după 20 zile (moară coloidală) ; 10. Extract nămol intoxicat după zile (moară coloidală) ; 11. Depozit nămol normal ; 12. Depozit nămol intoxicat 24 ore.

CERCETĂRI PRIVIND CARACTERIZAREA AMIDONULUI DIN MAZĂRE

B. SEGAL, R. SEGAL, D. GEORGESCU, I. BARBU, R. AMARFI, C. VÂŢĂ, D. SĂHLEANU

Rezumat. — Sînt studiate unele caracteristici ale amidonului din mazăre: compoziţia chimică, capacitatea de gelificare (diagramele Brabender), capacitatea de umflare, solubilitatea, fluiditatea şi rotaţia specifică. Se urmăreşte influenţa modului de izolare a amidonului, precum şi influenţa varietăţii de mazăre asupra caracteristicilor menţionate.

Pînă în prezent, caracterizarea fizico-chimică a amidonului din mazăre a fost puţin abordată, literatura de specialitate fiind săracă în referinţe în această problemă. Chiar în monografii de prestigiu, care au încercat să epuizeze toate problemele legate de amidon (1, 2, 3), despre amidonul din mazăre se aminteşte foarte puţin. Unele cercetări care au fost efectuate, abordează problema din punct de vedere al raportului între amiloză şi amilopectină (4, 5). Un studiu mai amplu a fost făcut de Schoch şi Maywald (6) care au stabilit identităţii între caracteristicile amidonului din mazăre şi ale amidonului din soiurile de porumb cu conţinut de 70% fracţiune liniară.

Pornind de la aceste considerente, ne-am propus să studiem următoarele proprietăţi ale amidonului izolat din mazăre: compoziţia chimică, capacitatea de gelificare, capacitatea de umflare, solubilitatea, fluiditatea şi rotaţia specifică, care prezintă interes pentru valorificarea industrială a amidonului.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru izolarea şi caracterizarea amidonului au fost luate în studiu două varietăţi de mazăre cultivată: Pisum sativum vulgare (cu bob neted, soiul Ceaplînski) şi Pisum sativum medulare (cu bob sbîrcit, soiul Mungomarck).

Izolarea amidonului s-a făcut după metoda (7) stabilită pentru obţinerea concentratelor proteice din mazăre, utilizînd ca mediu de extracţie: apă, soluţie de hidroxid de sodiu (pH 7,8) şi soluţie de bioxid de sulf (pH 2,5). Extracţia în apă s-a făcut pentru obţinerea amidonului în stare nemodificată; cea în alcalii s-a făcut în condiţiile în care se izolează proteinele din materii prime vegetale, iar extracţia în mediu de bioxid de sulf s-a făcut în condiţiile obţinerii amidonului, pe cale industrială, din materii prime amidonoase.

La amidonul nativ s-au determinat: umiditatea prin uscare la etuvă (8), cenuşa prin calcinare (8), azotul prin metoda Kjeldahl (8) şi fosforul colorimetric, sub forma complexului fosfomolibdenic (9).

Pentru caracterizarea reologică a amidonului s-a determinat capacitatea de gelificare cu amilograful Brabender, după metoda Smith (10), utilizînd o cuvă cu capacitatea de 450 ml şi suspensii de amidon cu concentraţii de 7,8,9, 10%.

Capacitatea de umflare a granulelor de amidon şi solubilitatea lor s-au determinat după metoda Schoch (10), la care s-au adus următoarele modificări: cantitatea de amidon luată în analiză a fost de 3 g; volumul de apă utilizată — 140 ml; volumul de supernatant luat pentru determinarea solubilităţii — 35 ml; încălzirea s-a făcut pe baie de apă electrică, cu reglarea automată a temperaturii.

Fluiditatea în alcalii s-a stabilit prin metoda Myers şi Smith (10) la temperatura de 25°C, cu un vîscozimetru Ostwald, cu capilar cu diametrul de 1 mm.

Puterea rotatorie specifică s-a determinat după metoda Dimler (10).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute referitor la compoziţia chimică brută, media a 8 determinări, (tabela 1) ne permit să menţionăm că, indiferent de varietatea de mazăre din care a fost izolat, amidonul are, în general, o com-

Tabela 1

Compoziţia chimică brută a amidonurilor izolate din mazăre

Componente	Amidon izolat din mazăre cu bob neted	Amidon izolat din mazăre cu bob sbîrcit
Umiditate, %	13,57 ± 0,15	12,8 ± 0,17
Cenuşă, %	0,37 ± 0,02	0,77 ± 0,025
Azot, %	0,15 ± 0,01	0,86 ± 0,016
Fosfor, %	0,078 ± 0,002	0,13 ± 0,008

poziţie asemănătoare. Diferenţele mai mari ce s-au înregistrat pentru cenuşă şi azot se pot explica prin faptul că în timpul extracţiei şi purificării amidonului din soiul Mungomarck, eliminarea impurităţilor este mai greu de realizat datorită dimensiunilor foarte mici ale granulelor.

Diagramele Brabender ale vîscozităţii pastelor de amidon provenit din diferite varietăţi de mazăre, în diferite condiţii de extracţie, prezintă caracteristici deosebite, ca o consecinţă a gradului de umflare diferit al granulelor de amidon şi a rezistenţei diferite la umflare în timpul încălzirii.

Astfel, pentru amidonul nativ, extras din soiul Ceaplînski (fig. 1), vîscozitatea pastei creşte pe măsura măririi concentraţiei suspensiei. Datorită repartizării uniforme a granulelor în apă, înregistrarea începe la 7—8 UB. După 10 minute de încălzire, cînd temperatura suspensiei devie 68°C, începe gelificarea, proces constatat prin creşterea vîscozităţii. Pe măsura creşterii acesteia, la probele cu concentraţii mari de amidon (*b*, *c*, *d*) s-a înregistrat şi o mărire a amplitudinii curbei de înregistrare. Acest lucru indică o creştere uniformă a consistenţei gelului de amidon pe măsură ce gelificarea înaintează.

De remarcat că după 180 minute de la începerea înregistrării nu se atinge un maxim de gelificare la nici-una din concentraţiile utilizate. La oprirea aparatului, curbele au încă o alură ascendentă. Sînt necesare concentraţii mai mari de 10% amidon pentru a se obţine curbe cu maxim de gelificare pronunţat.

În cazul, în care acelaşi amidon a fost izolat în mediu alcalin (fig. 2), gelificarea pastelor sale are loc abia după 25 minute de la începerea încăl-

zirii, adică atunci cînd temperatura este de 82°C. Vîscozitatea crește însă mai repede decît la proba de amidon nativ. Probele cu o concentrație de 7%(*a*) și 10%(*d*) amidon au prezentat creșteri lente ale vîscozității,

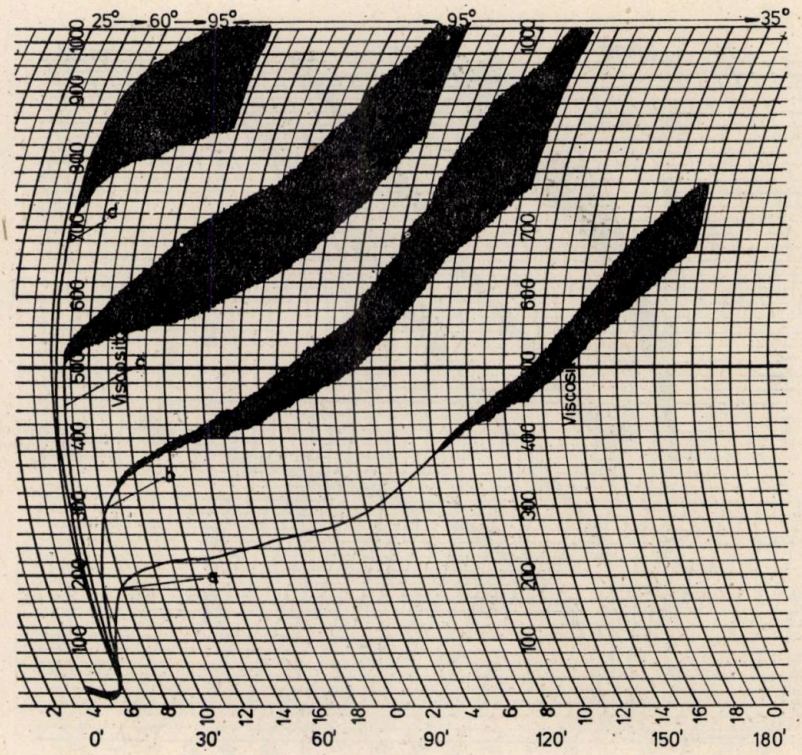


Fig. 1 — Curbele Brabender ale amidonului nativ din mazăre cu bob neted
a — concentrația suspensiei de amidon 7%; *b* — concentrația suspensiei de amidon 8%; *c* — concentrația suspensiei de amidon 9%; *d* — concentrația suspensiei de amidon 10 %

pe cînd pastele cu 8% și 9% (*b* și *c*) au înregistrat o creștere mai rapidă și liniară. În acest caz, numai proba cu o concentrație relativ ridicată de amidon (*d*) a dat o amplitudine mare a peniței înregistratoare (100 UB).

Gelificarea amidonului din soiul Ceaplînski, extras în mediu de SO_2 (fig. 3) începe brusc, la temperatura de 72° C. Viteza de gelificare a acestui amidon este mai mare decît a celui precedent. În 2—3 minute de la începerea gelificării, proba cu 7% amidon (3*a*) are o vîscozitate de 110 UB, pe cînd proba similară a amidonului extras în mediu alcalin (2*a*) atinge această vîscozitate abia după 20 minute. Situației asemănătoare se prezintă la toate concentrațiile acestui amidon, așa că, în final, după 150 minute de înregistrare, pastele au vîscozități mai mari decît pastele similare ale amidonului extras în mediu alcalin.

Acestea demonstrează că amidonul ce se separă din mazăre în timpul obţinerii concentratelor proteice dă paste cu vîscozităţi mai mici decît cel separat în condiţii identice cu cele din industria de obţinere a amidonului.

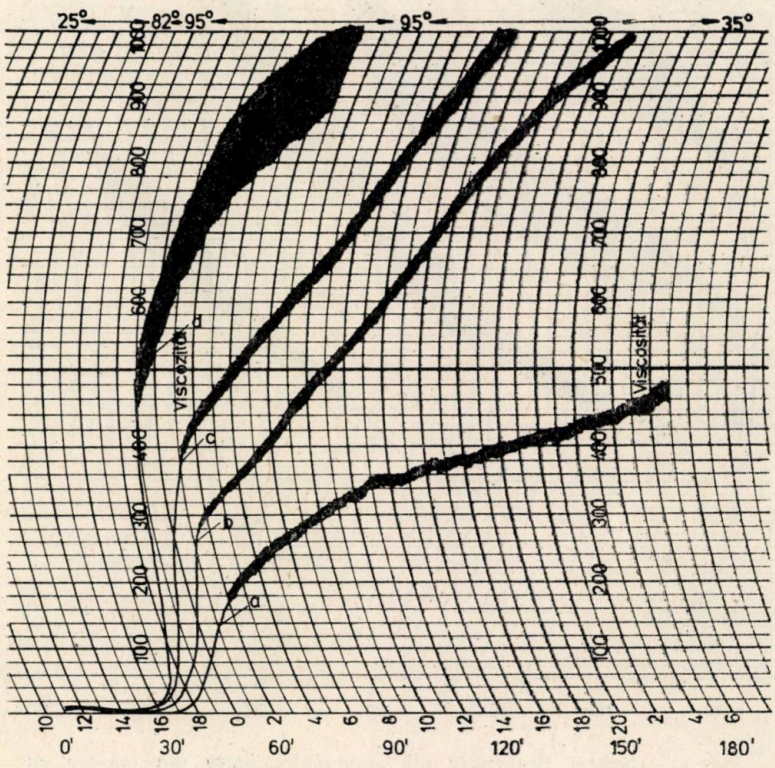


Fig. 2. — Curbele Brabender ale amidonului izolat din mazărea cu bob neted, în mediu alcalin.
a, b, c, d — aceleaşi semnificaţii.

În cazul amidonului extras din soiul de mazăre Mungomarck nu s-a produs gelificarea, indiferent de concentraţia suspensiei, de temperatura de încălzire şi de mediul din care a fost izolat amidonul (fig. 4 şi 5).

Deci, vîscozitatea pastelor de amidon din mazăre este influenţată de varietate şi de condiţiile de extracţie. Varietatea îşi pune amprenta mai puternic asupra calităţii amidonului.

Pe baza datelor înregistrate, aplicînd clasificarea lui Schoch şi Maywald pentru amidonurile din diferite surse, ajungem la concluzia că amidonul din mazărea cu bob neted este un amidon de tip C, adică cu capacitate de umflare restrînsă, caracteristică pentru legături chimice transversale. Legăturile transversale din interiorul granulei reduc consi-

derabil umflarea şi solubilizarea şi stabilizează granula umflată faţă de fragmentarea mecanică. Curbele Brabender ale acestui tip de amidon nu prezintă un maxim de pastificare, vîscozitatea rămînînd constantă sau crescînd în timpul încălzirii.

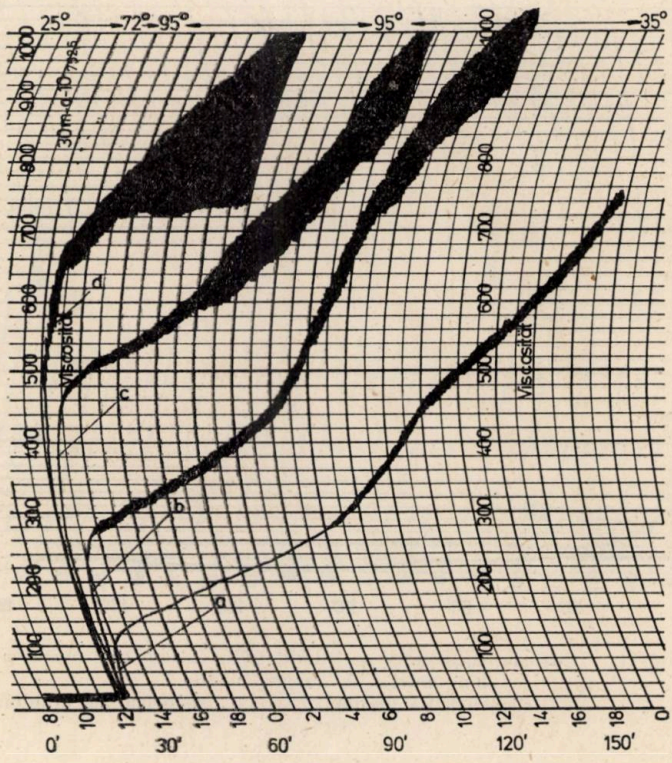


Fig. 3. — Curbele Brabender ale amidonului izolat din mazărea cu bob neted în mediu de SO_2.
a, b, c, d — aceleaşi semnificaţii.

Tot conform aceleiaşi clasificări, amidonul din mazărea cu bob sbîrcit este un amidon de tip D, adică cu capacitatea de umflare foarte restrînsă, caracteristică unui amidon cu conţinut ridicat de amiloză. Din cauza rigidităţii interne conferită de conţinutul mare de molecule lineare, granulele acestui amidon nu se umflă suficient pentru a da o pastă vîscoasă la încălzirea în apă la concentraţii normale.

La aceleaşi concluzii se ajunge prin determinarea capacităţii de umflare a celor două tipuri de amidon. Astfel, s-a constatat că amidonul din mazărea cu bob neted are o capacitate de umflare, la 20°C, cu aproximativ 70% mai mare decît a amidonului din mazărea cu bob sbîrcit (fig. 6). Prin creşterea temperaturii, capacitatea de umflare a acestui amidon rămîne mult în urma capacităţii de umflare a amidonului din soiul Ceaplînski.

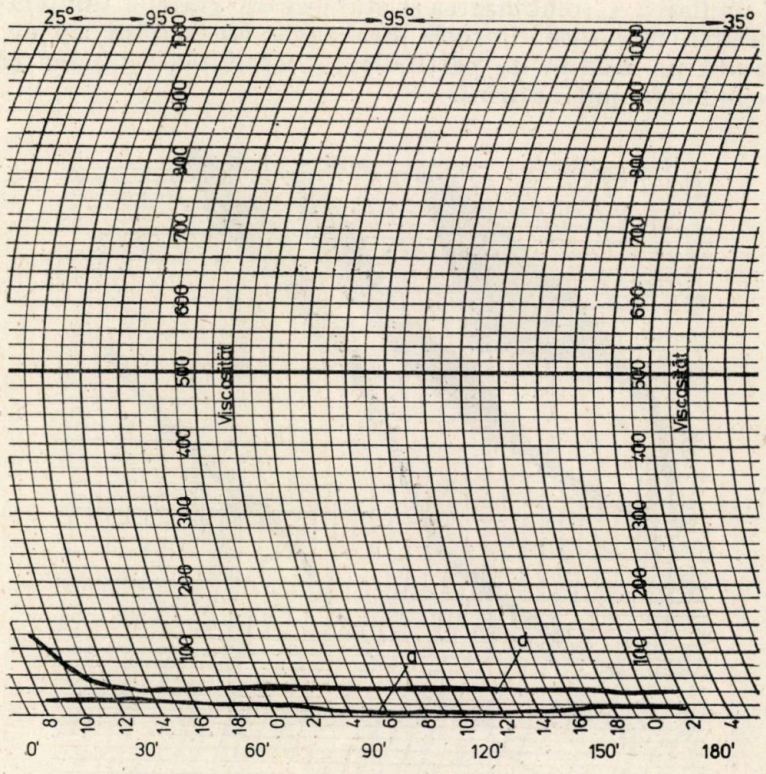


Fig. 4. — Curbele Brabender ale amidonului izolat din mazărea cu bob sbîrcit în mediu alcalin.
a — suspensii de amidon 7%; *d* — suspensii de amidon 10%.

Deosebiri, dar nu atît de mari, s-au înregistrat şi sub aspectul solubilităţii celor două tipuri de amidon (fig. 7). Dacă iniţial (la 75° C) există o oarecare diferenţă între solubilităţile lor, prin ridicarea temperaturii pînă la 100°C solubilităţile se egalează, ca urmare a faptului că amidonul din mazărea cu bob sbîrcit are o viteză mai mare de creştere a solubilităţii.

Pentru caracterizarea amidonului din mazăre am considerat necesar să urmărim şi proprietăţile de curgere ale soluţiilor alcaline (fluiditatea în alcalii).

Datele obţinute, media a 6 determinări (tabela 2), demonstrează că şi această caracteristică a amidonului din mazăre este influenţată atît de varietate, cît şi de condiţiile izolării. Amidonul din mazărea cu bob neted dă soluţii alcaline cu o fluiditate mai mică decît amidonul din mazărea cu bob sbîrcit. În afară de aceasta, izolarea în mediu alcalin permite obţinerea unor amidonuri care dau paste mai fluide decît izolarea în mediu acid.

Determinările privind puterea rotatorie specifică a amidonului din mazăre au dus la concluzia că indiferent de metoda de izolare utilizată şi de varietatea folosită, această constantă are valoarea +203°.

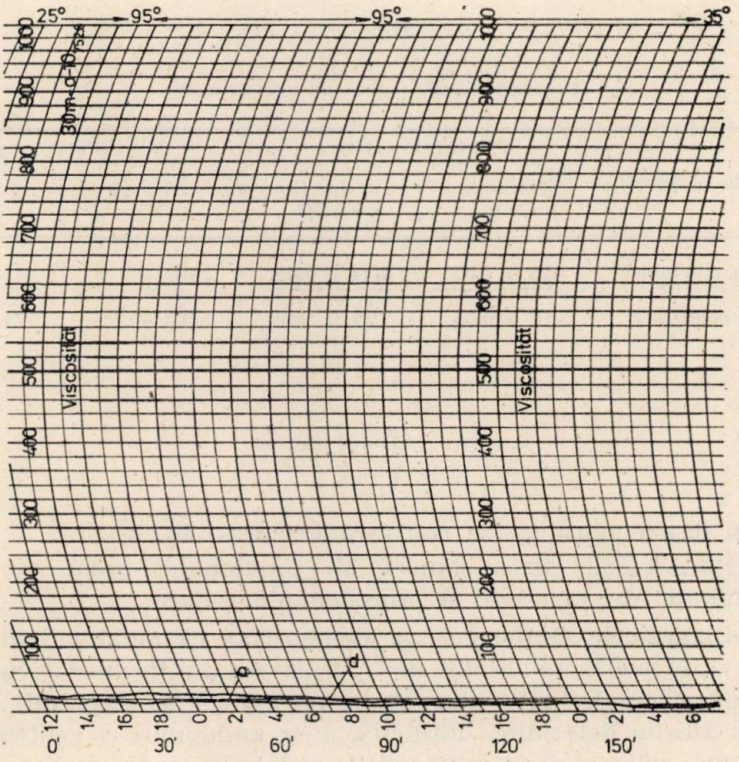


Fig. 5. — Curbele Brabender ale amidonului izolat din mazăre cu bob sbîrcit, în mediu de SO_2.
a, *d* — aceleași semnificații.

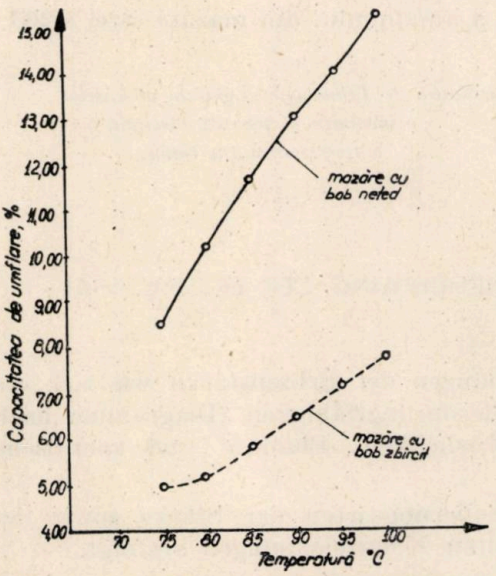


Fig. 6. — Variația capacității de umflare a amidonului din mazăre în funcție de temperatură.

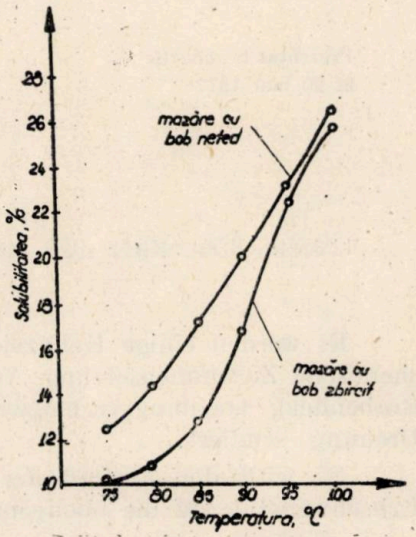


Fig. 7. — Variația solubilității amidonului din mazăre în funcție de temperatură.

Tabela 2

Fluiditatea în alcalii a amidonului izolat din mazăre

Tipul de amidon	Viscozitate relativă		Viscozitate proprie	
	Extracţie SO_2	Extracţie NaOH	Extracţie SO_2	Extracţie NaOH
Mazăre cu bob neted	3,56 ± 0,07	3,34 ± 0,03	253,8 ± 1,4	241,0 ± 2,3
Mazăre cu bob sbîrcit	2,78 ± 0,03	2,39 ± 0,02	204,3 ± 2,9	174,4 ± 2,5

CONCLUZII

Din datele obţinute se constată următoarele:

1. Proprietăţile fizico-chimice ale amidonului izolat din mazăre sînt în funcţie de varietate şi procedeul de izolare.

2. Diagramele Brabender au demonstrat că amidonul din Pisum sativum vulgare este un amidon de tip C, iar cel din Pisum sativum medulare este de tipul D (după clasificarea lui Schoch şi Maywald); izolarea în mediu alcalin determină obţinerea unor amidonuri ce gelifică la temperaturi mai ridicate decît amidonurile izolate în mediu de SO_2.

3. Capacitatea de umflare şi solubilitatea amidonului izolat din *Pisum sativum vulgare* sînt mai mari decît ale amidonului izolat din *Pisum sativum medulare.*

4. Puterea rotatorie specifică a amidonului din mazăre este +203°.

Prezentat la redacţie
la 20 mai 1977

Facultatea de Tehnologia şi chimia produselor alimentare şi tehnică piscicolă
Universitatea din Galaţi

UNTERSUCHUNGEN ZUR KENNZEICHNUNG DER ERBSENSTÄRKE

Es werden einige Kennzeichnungen der Erbsenstärke wie z.B. die chemische Zusammensetzung, Verkleisterungsfähigkeit (Diagramme nach Brabender), Quellungsvermögen, Löslichkeit, Fluidität und spezifische Drehung studiert.

Es wird der Einfluß der Isolierungsarten der Stärke sowie der Erbsenvarietät auf die obengenannten Kennzeichnungen verfolgt.

BIBLIOGRAFIE

1. W. Paschall, Starch, Chemistry and Technology, vol. 1, Academic Press, New-York and, London, 1965.
2. R. W. Kerr, Starch and its Derivates, vol. 1, Chapman and Hall, London, 1959
3. J. W. Knight, The Starch Industry, Pergamon Press, London, 1965.
4. A. Schneider, Zucker, **21**, 215 (1951).
5. M. I. Kneaghincev, L. N. Samarina, Pricladnaia biohimia i microbiologhia, **9**, 436 (1973).
6. T. J. Schoch, E. C. Maywald, Cereal Chemistry, **45**, 564 (1968).
7. R. Segal, B. Segal, Industria Alimentara, **22**, 637 (1971).
8. B. Segal, R. Segal, Metode rapide de analiză în industia alimentară, Editura Tehnică, București, 1966.
9. I. P. Alimarin, B. I. Frid, Microanaliză chimică cantitativă, Editura Tehnică, București 1962.
10. R. L. Whister, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. IV, Academic Press, London, 1964.
11. R. D. Patel, Cereal Chemistry, **37**, 500 (1960).

COMPORTAREA UNOR ENZIME ŞI CATIONI DIN SERUL SANGUIN ÎN LEUCOZA BOVINĂ

MARIA ŞUŢEANU, M. ŞERBAN, E. ŞUŢEANU

Rezumat. În serul sanguin provenit de la bovine cu leucoză s-au pus în evidenţă modificări ale activităţii lizozimului şi fosfatazei alcaline. Activitatea lactat dehidrogenazei, aldolazei şi alanin aminotransferazei, prezintă uşoare modificări în leucoza bovină. Determinarea activităţii lizozimului poate furniza indicaţii orientative pentru depistarea pe cale biochimică a leucozei bovine, în corelaţie cu examenul hematologic.

Definită într-o accepţiune generală, leucoza reprezintă ansamblul proceselor de natură tumorală ale ţesutului leucopoetic caracterizată printr-o dereglare a diferenţierii leucocitare şi respectiv printr-o creştere a numărului de leucocite (1) (2).

Dacă simptomele şi evoluţia clinică a leucozei pot fi, în general, corelate cu unele modificări histo-morfologice sau hematologice, bazele biochimice ale acestei boli rămîn însă neelucidate. Datele existente referitoare la evoluţia unor componente biochimice în leucoză atît la nivel de organ cît şi în sînge sînt relativ puţine, disparate şi adesea contradictorii (3—5).

Pe baza acestor considerente şi pornind de la premisa că efectele leucozei s-ar putea reflecta şi pe plan biochimic la nivelul sîngelui, în această notă ne-am propus ca obiectiv să investigăm în serul de bovine afectate de leucoză comportarea activităţii unor enzime implicate în diferite catene metabolice, precum şi a unor cationi. Asemenea cercetări ar putea furniza, în corelaţie cu examenul hematologic, indicaţii de orientare în legătură cu posibilitatea depistării şi diagnosticării leucozei bovine.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe serul sanguin provenit de la un număr de 56 vaci din zona de sud şi sud-est a ţării. Acestea au fost grupate în următoarele trei loturi : lot considerat normal, lot presupus cu leucoză (dubioase) şi lot cu leucoză declarată (pozitive). Apartenenţa la aceste loturi a fost stabilită prin procedeul curent de diagnosticare a leucozei prin examen hematologic pe baza cheiei leucozice (5) *.

Sîngele recoltat în absenţă de anticoagulant a fost supus timp de 15 minute unei centrifugări de 800 × g. Serul astfel obţinut a fost utilizat pentru efectuarea determinărilor enzimatice şi de cationi.

---

* Examenul hematologic a fost efectuat de către Laboratorul Central de diagnostic sanitar veterinar.

Activitatea lactat dehidrogenazei (EC 1.1.1.27) s-a determinat spectrofotometric la $\lambda = 340$ nm, urmărindu-se oxidarea NADH în prezenţa piruvatului ca substrat (7); activitatea enzimatică s-a exprimat în unităţi enzimatice raportate la un ml de ser (o unitate enzimatică reprezintă acea activitate care produce modificarea absorbţiei cu 1.10^{-3}/min/ml la +25°C).

Activitatea aldolazei (E C 4.1.2.) s-a determinat spectrocolorimetric la $\lambda = 540$ nm pe baza reacţiei de culoare formată, în prezenţa 2,4-dinitrofenilhidrazinei, de către produşii de scindare enzimatică a fructozo — 1,6-difosfatului (FDP) utilizat ca substrat; activitatea enzimatică s-a exprimat în µM FDP scindaţi/ml/oră la +37°C.

Activitatea fosfatazei alcaline (E C 3.1.3.1.) s-a determinat spectrocolorimetric la $\lambda = 420$ nm, utilizat ca substrat p-nitrofenilfosfatul (10); activitatea enzimatică s-a exprimat în UI (µM p-nitrofenol format/min/1 la +37°C).

Activitatea aspartat aminotransferazei (E C 2.6.1.1.) s-a determinat spectrocolorimetric la $\lambda = 530$ nm pe baza reacţiei de culoare dintre acidul piruvic format şi 2,4-dinitrofenilhidrazină, utilizînd ca substrat acid DL aspartic 200 mM şi acid α-cetoglutaric 2 mM (10); activitatea enzimatică s-a exprimat în UI (µM piruvat/min/1 la +37°C).

Activitatea alanin aminotransferazei (E. C 2.6.1.2.) s-a determinat în mod similar cu aceea a aspartat aminotransferazei (10), utilizînd însă ca substrat DL alanină 200 mM şi acid α-cetoglutaric 2 mM; activitatea enzimatică s-a exprimat, de asemenea, în UI.

Activitatea lizozimului s-a determinat turbidimetric la pH = 6,2 şi $\lambda = 645$ nm; valoarea extincţiilor a fost stabilită la 30 sec şi respectiv la 3 min de la adăugarea enzimei peste suspensia de *Micrococus lysodeikticus*; diferenţele dintre extincţiile obţinute la cele două intervale de timp au fost raportate la o curbă etalon, iar valorile obţinute s-au exprimat în γ lizozim/ml ser (11)(12).

Proteinele au fost dozate spectrocolorimetric prin metoda biuretului la $\lambda = 570$ nm; proteinemia s-a exprimat în g proteine/100 ml ser (10).

Cationii K^+, Na^+ şi Ca^{2+} s-au determinat prin metoda flamfotometrică, iar rezultatele s-au exprimat în mE/1.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza datelor experimentale obţinute, rezultă că în leucoza bovină se evidenţiază anumite modificări la nivelul activităţii unora din enzimele serice cercetate. În tabela 1 sînt prezentate valorile medii ale activităţii lizozimului, fosfatazei alcaline, lactat dehidrogenazei, alanin aminotransferazei şi aldolazei din serul de bovine provenit de la lotul normal, lotul presupus cu leucoză şi lotul cu leucoză.

Din datele prezentate se remarcă creşterea marcantă a activităţii lizozimului din serul bovinelor afectate de leucoză, şi anume cu 31,9% în raport cu lotul considerat normal. Această modificare a activităţii lizozimului se corelează cu creşterea numărului de leucocite şi poate fi interpretată în sensul unei eliberări parţiale a enzimei din leucocite sau biosintezei sale asociată cu procesul leucotic. De altfel, în patologia umană este cunoscut faptul că creşterea activităţii lizozimului însoţeşte leucemia de tip mielomonocitar şi monocitar.

Şi în cazul fosfatazei alcaline se înregistrează o creştere notabilă a activităţii la lotul cu leucoză (24,5%) ca de altfel şi la lotul presupus cu leucoză. Această modificare a activităţii fosfatazei s-ar putea datora unei solicitări mai mari a enzimei în diferite procese de hidroliză a esterilor fosforici în care este implicată, ca o reflectare a procesului patogen. În acest sens, ar pleda şi uşoara diminuare (13,0%) a activităţii aldolazei

Tabela 1

Valorile medii ale activității unor enzime din serul de bovine normale, presupuse cu leucoză și cu leucoză

Loturi	Enzime														
	Lizozim			Fosfataza			LDH*			AAT**			Aldolaza		
	Valori medii	Valori extreme	Δ%	Valori medii	Valori extreme	Δ%	Valori medii	Valori extreme	Δ%	Valori medii	Valori extreme	Δ%	Valori medii	Valori extreme	Δ%
Normal	4,7	2,8–6,6		22,9	15,3–38,0		1625	1320–2040		28,5	20,7–40,7		37,5	26,6–44,4	
Presupus cu leucoză	5,0	4,0–6,6		26,7	20,7–42,3		1580	1440–1960		29,2	21,2–35,3		27,9	21,3–37,0	
cu leucoză	6,2	4,6–8,0	+31,9	28,4	20,3–42,7	+24,5	1870	1660–2520	+15,0	32,9	24,6–40,7	+14,2	32,6	20,0–46,2	−13,0

* Lcatat dehidrogenază

** Alanin aminotransferaza

Tabela 2

Valorile K^+, Na^+ și Ca^{2+} (mE/l) din serul de bovine normale, presupuse cu leucoză și cu leucoză

Loturi	K^+		Na^+		Ca^{2+}	
	Valori medii	Valori extreme	Valori medii	Valori extreme	Valori medii	Valori extreme
Normal	4,7	4,0–5,0	147,3	144–154	4,7	4,0–5,1
Presupus cu leucoză	5,0	4,1–5,4	148,3	144–152	4,6	4,0–4,8
Cu leucoză	5,3	4,3–5,6	149,0	144–154	4,5	4,2–5,2

din serul bovinelor cu leucoză, diminuare asociată cu o posibilă scădere a concentraţiei substratului de reacţie, fructozo-1,6-difosfatul.

Nu este însă exclusă nici posibilitatea ca activitatea crescută a fosfatazei să fie corelată şi cu unele modificări la nivelul membranei leucocitare, a cărei permeabilitate poate fi alterată în leucoză.

Activitatea lactat dehidrogenazei prezintă o tendinţă de creştere (15,0%) în leucoza bovină, fapt care poate fi corelat cu existenţa unui prag mai ridicat al acestei enzime în leucocit, şi respectiv cu eliberarea sa într-o anumită proporţie din leucocit. La nivelul izoenzimelor lactat dehidrogenazei nu se constată însă modificări semnificative.

Referitor la activitatea transaminazelor serice, în leucoza bovină se constată, de asemenea, o uşoară creştere a activităţii alanin aminotransferazei (14,2%), spre deosebire de activitatea aspartat aminotransferazei care se menţine la o valoare asemănătoare cu cea a lotului considerat normal. Comportarea diferită a celor două transaminaze poate fi atribuită faptului că aspartat aminotransferaza de origine citoplasmatică manifestă un turnover mai mare în comparaţie cu alanin aminotransferaza.

Concentraţia proteinelor serice la lotul cu leucoză indică valori similare cu cele înregistrate la lotul considerat normal sau presupus cu leucoză.

Dintre cationii investigaţi, unele modificări se constată numai la nivelul K^+. Din tabela 2 rezultă că potasemia prezintă o tendinţă de creştere în leucoză (12,8%); valorile natremiei şi calcemiei se menţin în limite normale.

Rezultatele preliminare obţinute relevă astfel că în serul bovinelor cu leucoză se evidenţiază anumite modificări în comportarea activităţii unor enzime şi, în special, a lizozimului şi fosfatazei alcaline. În acest sens, considerăm că determinarea activităţii acestor enzime şi, în primul rînd, a lizozimului poate furniza indicaţii de orientare, în legătură cu diagnosticarea pe cale biochimică a stării de leucoză la bovine, în strînsă corelaţie cu examenul hematologic.

CONCLUZII

— În serul sanguin al bovinelor afectate de leucoză se evidenţiază o creştere a activităţii lizozimului şi a fosfatazei alcaline.

— Deşi nespecifică, activitatea lizozimului ca şi a fosfatazei alcaline, poate constitui un indice biochimic de diagnosticare a leucozei bovine, asociat cu examenul hematologic.

— Activitatea lactat dehidrogenazei, aldolazei şi alanin aminotransferazei prezintă uşoare modificări în leucoza bovină.

Prezentat la redacţie
la 28 septembrie 1977

Disciplina de Biochimie
Facultatea de Zootehnie Bucureşti

THE BEHAVIOUR OF SOME ENZYMES AND CATHIONS IN BLOOD SERUM IN BOVINE LEUCOSIS

SUMMARY

Alterations of lysosium and alkaline phosphatase activities were found in the blood serum taken from leucosis diagnostized bovines. Slight alterations only were observed for lactate dehydrogenase, aldolase and alanin aminotransferase activities în cases of bovine leucosis. The estimation of lysosim may offer some orientative information for biochemical detection of bovine leucosis, correlated with hematologic tests.

BIBLIOGRAFIE

1. H. J. Bendixen, Adv. Vet. Sci., **10**, 129 (1965).
2. T. Negrutiu, Z. Sîrbu, în *Aspecte noi în leucoza bovină*, Ed. Agrosilvică, 1968, pag. 7.
3. V. Albrycht, Bull. Vet. Inst. Pulany, **14**, 75 (1970).
4. L. M. Buruiană, Elena Hadarag, Maria Șuteanu, Anca Dema, Marta Lerch, M. Petculescu, Lucr. St. IANB seria D, **XIII**, 373 (1970).
5. E. N. Abramova, V. S. Kondratiev, I. A. Sttinskii, Selsk. hz, biologhia, **7**, 507 (1972).
6. R. Goetze, G. Rosenberger, G. Ziegehagen, Dtsch. tierärztl. Wschr. **63**, 85 (1956).
7. H. U. Bergmeyer, E. Bernt, B. Hess, în *Methoden der ezymatischen Analyse*, Verlag chemie, Weinheim, 1962, pag. 736.
8. S. Reitman, S. Frankel, Am. J. Clin. Path., **28**, 56 (1956).
9. H. U. Bergmeyer, in *Methods of enzymatic analysis*, 1965, pag. 724.
10. M. Șerban, Alexandria Lozinschi, Gh. Cîmpeanu, *Manual de lucrări practice de biochimie animală*, AMD. IANB, 1975, pag. 206.
11. A. L. Prasad, G. Litwack, Ann. Biochem., **6**, 328 (1963).
12. G. Gorin, S. F. Wang, L. Papapaulou, Ann. Biochem., **39**, 113 (1971).

CERCETĂRI ASUPRA SAPONINELOR TRITERPENICE DIN PLANTE MEDICINALE INDIGENE

M. TĂMAŞ, VIORICA HODIŞAN, LUCIA GRECU, E. FĂGĂRĂŞAN, MARIA BACIU şi ILEANA MUICĂ

Rezumat. S-a izolat şi s-a determinat, gravimetric, conţinutul în saponine triterpenice din 14 specii de plante medicinale indigene. Prin analize cromatografice s-au studiat calitativ saponozidele şi sapogeninele acestora şi s-a determinat indicele hemolitic al saponinelor izolate din cele 14 specii.

Saponinele triterpenice, glicozide ale unor triterpene pentaciclice, sînt substanţe naturale, a căror răspîndire în plante caracterizează unele unităţi sistematice (1, 2, 3).

Numeroase droguri medicinale cu saponine se utilizează în prezent la prepararea unor ceaiuri, tincturi, datorită proprietăţilor lor expectorante, depurative, antimicotice, citostatice, diuretice, saluretice, ş.a. (4, 5). Saponinele triterpenice contribuie la solubilizarea în organism a unor medicamente. Sînt utilizate şi în industria textilă, alimentară, cosmetică (1).

Datorită dificultăţilor de izolare şi purificare, pînă în prezent au fost introduse puţine saponine triterpenice în fitoterapie, dar se utilizează, în continuare, numeroase droguri cu conţinut în asemenea substanţe. Totuşi pentru anumite saponine s-au descoperit acţiuni specifice, ce deschid perspective de utilizare a lor în fitoterapie (vasoprotectoare, antiexudative, tonifiante, antiulceroase, în afecţiuni cardiovasculare) (1, 6, 7, 8, 9, 10).

Se mai cunoaşte, de asemenea, acţiunea lor hemolizantă şi proprietatea de a forma complexe greu solubile cu colesterolul (1,6).

Cunoscînd principalele unităţi taxonomice care conţin saponine triterpenice (11, 12) şi plantele medicinale indigene în care este citată prezenţa lor (4, 7, 10), ne-am propus să izolăm şi purificăm saponinele triterpenice şi să efectuăm o determinare cantitativă a lor din unele droguri medicinale indigene. De asemenea am urmărit şi un studiu calitativ prin care să precizăm numărul saponozidelor, a sapogeninelor rezultate în urma hidrolizei acide şi identificarea cromatografică a lor, în limita substanţelor de referinţă.

Menţionăm că pentru plantele luate de noi în studiu, nu au mai fost efectuate cercetări fitochimice la noi în ţară şi că pentru majoritatea dintre ele nu se cunoaşte încă nici conţinutul în saponine şi nici numărul fracţiunilor şi natura aglieonilor.

St. cerc. biochim., 21, (1), 89–94, (1978)

În prezent detectarea saponinelor triterpenice în plante se face prin metode fitochimice și biologice, între care indicele de spumificare, indicele hemolitic, metode cromatografice (13, 14, 15).

Pînă în prezent au fost analizate și caracterizate chimic un număr foarte mic de saponozide triterpenice, caracterizarea lor se face mai cu seamă pentru agliconi, prin analize spectrale în IR (1, 16, 17, 18).

MATERIAL ȘI METODE

Am luat în studiu 14 specii indigene (tabela I), dintre care 7 aparțin fam. *Caryophyllaceae* și *Primulaceae*, caracterizate chemotaxonomic prin conținutul lor în saponine triterpenice. Materialul vegetal a fost uscat la temperatura camerei, apoi măcinat în vederea obținerii unei pulberi fine.

Extragerea și izolarea saponinelor am efectuat-o după metoda GRECU și CUCU (15, 18), urmată de purificarea saponinei brute prin reprecipitări în acetonă. Determinarea cantitativă s-a efectuat gravimetric, prin raportarea la material vegetal lipsit de umiditate.

Analiza calitativă a saponozidelor s-a efectuat prin cromatografie pe strat subțire de silicagel G (Merck), aplicînd spoturi liniare, de 2 cm lățime, dintr-o soluție 1% a saponinelor, în metanol 80%.

Dintre sistemele de solvenți, cele mai bune rezultate le-am obținut cu I: n-butanol--acid acetic-apă (6 : 1 : 3) și II: isopropanol-apă-acid formic (80 : 15 : 5). Am utilizat cromatoplăci de 15 × 20 cm, grosimea stratului de 0,25 mm, distanța de migrare 15 cm timp de migrare 90 min.

După uscare cromatograma s-a pulverizat cu următorii reactivi, citați ca specifici pentru saponinele triterpenice:

- Liberman-Burchard (colorație brună și fluorescență în UV. (1, 20).
- $SbCl_3$ sol. 20% în cloroform (brun deschis-cenușiu) (1, 15, 16).
- aldehidă anisică-acid fosfomolibdenic — H_2SO_4 (albastru închis) (14).
- vanilină-acid fosforic (roz-brun) (19)
- p-DAB (brun-gălbui) (1,7)
- acid fosfowolframic 20% în etanol (roșu-roz) (1) toate acestea urmate de încălzire la 110°C, timp de 5 min,
- suspensie de gelatină-sînge (14).

Hidroliza saponozidelor, în vederea obținerii agliconilor, am efectuat-o cu HCl 2N, în amestec de apă și dioxan și un strat protector de benzen, timp de 2 ore la reflux, pe baia de apă în fierbere (18). După răcire, agliconii s-au extras cu cloroform, trecut apoi peste sulfat de sodiu sicc. și agliconii astfel rezultați s-au supus analizei cromatografice pe strat subțire de silicagel G, în sistemele I: cloroform-acetonă (5,5 : 1) și II: eter de petrol-acetat de etil-benzen-acid acetic (30 : 18 : 60 : 1,5) iar identificarea s-a efectuat prin pulverizare cu reactivii: $SbCl_3$, acid fosfowolframic și vanilină — H_2SO_4. Ca substanțe de referință pentru saponine am utilizat gipsogenina (obținută prin hidroliza saponinei albe pure Merck), acidul quillaic (obținut prin hidroliza saponinei din Quillaja saponaria) și acidul oleanolic.

Stabilirea indicelui hemolitic s-a efectuat după metoda clasică, cu sînge de bovină defibrinat (2). Soluțiile de saponine s-au efectuat pornind de la concentrația de 1% (în ser fiziologic), urmînd apoi diluții mai mari (0,1 0,01%) în cazul în care hemoliza s-a produs în toate cele 10 eprubete, respectiv concentrații mai mari în cazul în care hemoliza nu s-a produs nici în prima eprubetă.

Avînd în vedere că indicele hemolitic depinde și de pH-ul soluțiilor de saponine, am efectuat și determinarea pH-ului la soluțiile 1% de saponine, la un PH-metru OP—207.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. *Conținutul în saponine triterpenice.* Toate drogurile studiate de noi conțin saponine într-un procent ridicat (tabela 1). Un conținut foarte ridicat de saponine prezintă *Herniaria glabra Lamium album* și *Herniaria*

hirsuta, *Viola tricolor*, în timp ce *Polygala amara*, are un conținut mai scăzut.

Saponinele izolate se prezintă sub formă de pulbere albă-albă găbuie, ușor higroscopice.

Tabela 1

cu speciile studiate și conținutul lor în saponine brute

Nr. crt.	Specia	Familia	Drogul	Locul și data recoltării	Conținutul în saponine (g%)
1	Batula verrucosa Ehrh.	Betulaceae	Folium	Grăd. Bot. Cluj sept. 1976	8,00
2	Herniaria glabra L.	Caryophyllaceae	Herba	Păd. Neagră-Bihor iunie 1976	9,40
	,,	,,	,,	Grăd. Bot. Cluj iulie 1976	16,25
3	H. hirsuta L.	,,	,,	,,	10,20
4	Lychnis flos-cuculi L.	,,	,,	Păd. Neagră-Bihor iunie 1976	3,50
5	Scleranthus annuus L.	,,	,,	Păd. Neagră-Bihor iunie 1976	6,20
6	Viola tricolor L.	Violaceae	,,	Ciucea — Cluj mai 1976	14,80
7	Polygala vulgaris L.	Polygalaceae	,,	Ciucea — Cluj iunie 1976	1,11
8	Anagallis arvensis L.	Primulaceae	,,	Grăd. Fac. Farmacie iunie 1976	6,00
9	Lysimachia nummularia L.	,,	,,	Grăd. Bot. Cluj iulie 1976	9,00
10	Ly. vulgaris L.	,,	,,	Marghita-Bihor iunie 1976	8,70
11	Polemonium coeruleum L.	,,	Radix	Grăd. Fac. Farmacie sept. 1976	8,20
12	Gratiola officinalis L.	Scrophulariaceae	Herba	Marghita — Bihor iunie 1976	2,40
13	Lamium album L.	Labiatae	Flores	Grăd. Bot. Cluj iunie 1976	14,50
14	Calendula officinalis L.	Compositae	,,	Plafar Cluj	4,20

2. *Analiza calitativă a saponozidelor*, efectuată prin cromatografie pe strat subțire (fig. 1), relevă că aceste saponine nu sînt unitare ci reprezintă un amestec de mai multe saponozide, natura lor triterpenică fiind verificată cu mai mulți reactivi. Pentru o specie dată, intensitatea petelor și nuanța culorii diferă, ceea ce ne dă indicații în legătură cu proporția în care se găsește fiecare saponozidă. Din analiza figurii 1 se poate constata că petele sînt foarte bine delimitate și departajate în sistemul I de solvenți.

Cele mai numeroase fracțiuni (saponozide) sînt prezente în saponinele izolate din *Herniaria glabra* (8), *H. hirsuta* (7), *Polemonium coeruleum* (8), *Lychnis flos-cuculi* (7), iar cele mai puține, saponinele din *Viola tricolor* (1), *Anagalis arvensis* (2) și *Lamium album* (3).

Numărul saponozidelor separate cromatografic de noi concordă cu cele din literatură, pentru *H. glabra* (19) și este mai mare decît cel cunoscut în literatură pînă în prezent, pentru celelalte specii (1, 7, 12).

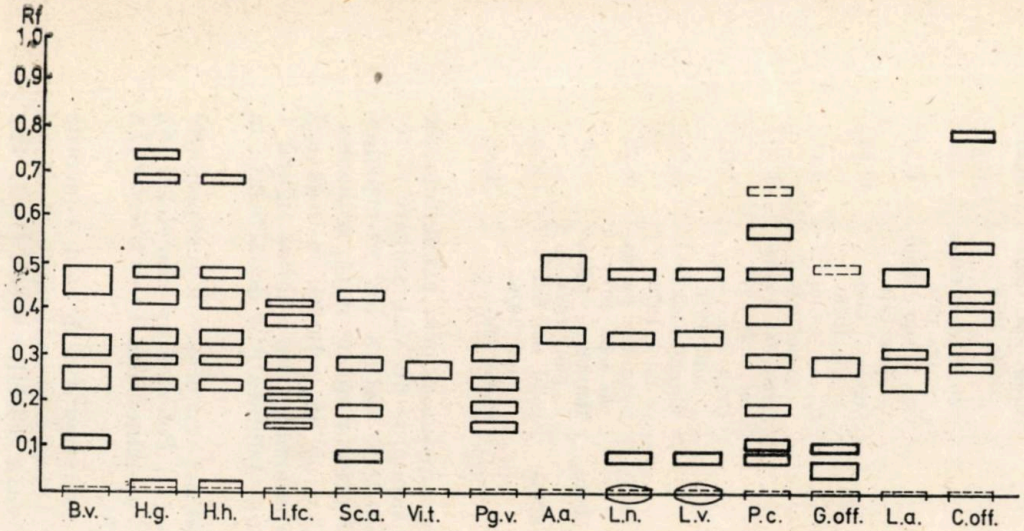


Fig. 1. — Cromatograma pe strat subțire a saponozidelor. Sistem de solvenți : n-butanol-acid-acetic-apă (6 : 1 : 3). Identificare cu reactiv Liebermann-Burchardat. B.v-*Betula verrucosa*; H.g.-*Herniaria glabra*; H. h. — *H. hirsuta*; Li.fc.-*Lychnis flos-cuculi*; Șc. a.— *Scleranthus annuus*; Vi. t.— *Viola tricolor*; Pg. a. — *Polygala amara A.* a. — *Anagalis arvensis*; L. n. — *Lysimachia numularia*; L.v. — *L-vulgaris*; P.c. — *Polemonium coeruleum*; G. off. — *Gratiola off.*; L. a. — *Lamium album*; C. off. *Caendulla off.*

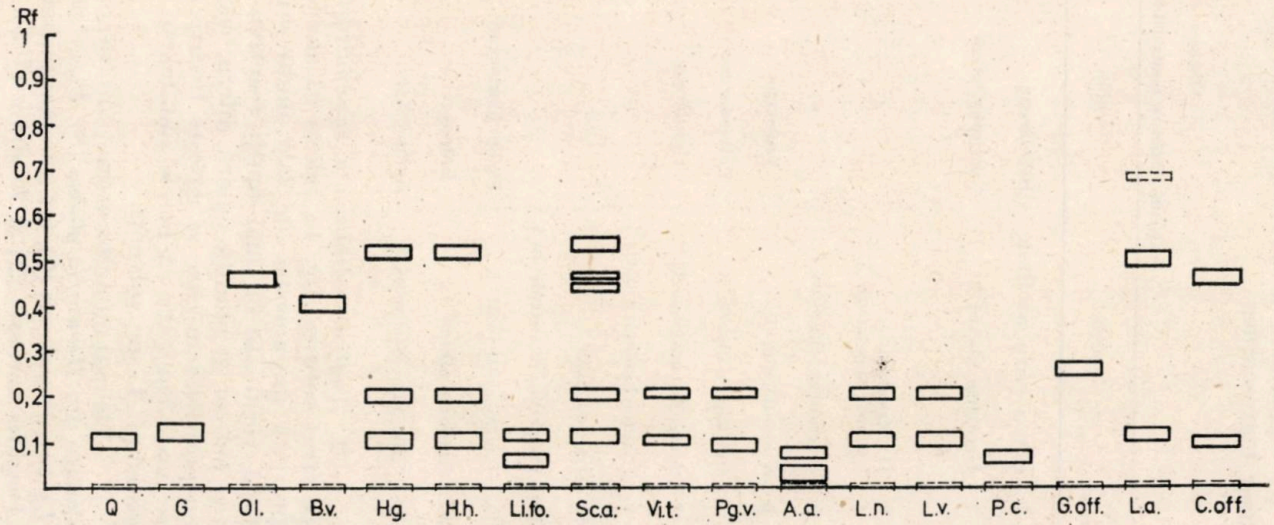


Fig. 2. — Cromatograma pe strat subțire a sapogeninelor. Sistem de solvenți ; eter de petrolbenzen-acetat de etil-acid acetic (30 : 60 : 18 : 1,5). Identificare cu acid fosfowolframic. Legenda ca și la fig. 1.

3. *Analiza calitativă a sapogeninelor.* Agliconii rezultați în urma hidrolizei acide i-am separat și identificat cromatografic. Cele mai bune rezultate le-am obținut cu sistemul II și cu reactivul acid fosfowolframic (fig. 2).

Se constată că numărul sapogeninelor este mult mai mic decît al saponozidelor, explicabil prin modul diferit de glicozidare.

Pe lîngă spoturile principale se mai pot pune în evidență și alte spoturi de intensitate redusă, care presupunem că reprezintă produși de degradare în urma hidrolizei (9, 18).

Prin compararea valorilor Rf și a culorii petelor am evidențiat prezența gipsogeninei în numeroase specii : *Lychnis floscuculi*, *Scleranthus annuus*, *Lysimachia nummularia*, *L. vulgaris* și *Lamium abum*, acidul quilaic în *Herniaria glabra* și *H. hirsuta* iar acidul oleanolic, citat și în literatură (1, 4), pentru *Calendula officinalis*.

Sapogenina din *Betula verrucosa* presupunem că reprezintă betulafolientriolul, citat ca sapogenină principală în această specie (1), iar la *Gratiola off.*, apare tot o singură pată ce corespunde gratiogeninei, studiată de Tschetsche și col (16).

Avînd în vedere că numărul și valoarea Rf a saponinelor și sapogeninelor este un caracter de specie, prin analiza cromatografică a lor se poate face o identificare a drogurilor provenite de la aceste specii în caz de substituiri sau falsificări.

4. *Indicele hemolitic* (tabela 2), variază în funcție de specia de la care s-a obținut saponina. Există două saponine (*Lysimachia sp.*) la care hemoliza nu s-a produs nici la concentrația de 2%, fapt semnalat și în literatură (1, 12).

Cele mai multe saponine prezintă un indice hemolitic cuprins între 2500 — 6666, iar cele mai ridicate valori le prezintă saponinele extrase din *Anagalis arvensis* și *Polemonium coeruleum* (40.000 și respectiv 22.222) Un indice hemolitic scăzut prezintă saponinele din *Lamium album*.

Majoritatea saponinelor în soluții de 1%, prezintă un pH acid, datorită grupărilor carboxilice libere, caracteristice acestor substanțe sau unor acizi glucuronici participanți la glicozidare.

Tabela 2

cu indicile hemolitic și pH-ul saponinelor studiate.

Nr. crt.	Specia	Conc. %	ml	I.H.	pH
1	Betula verrucosa Ehr.	0,1	0,8	2.500	6,04
2	Herniaria glabra L.	0,1	0,4	5.000	6,04
3	H. hirsuta L.	0,1	0,4	5.000	6,04
4	Lychnis flos-cuculi L.	0,1	0,3	6.666	7,06
5	Scleranthus annuus L.	0,1	0,6	3.333	5,25
6	Viola tricolor L.	0,1	0,5	4.000	7,10
7	Polygala vulgaris L.	—	—	—	—
8	Anagallis arvensis L.	0,001	0,5	40.000	6,92
9	Lysimachia nummularia L	2	Nu hemolizează		6,51
10	Ly. vulgaris L.	2	,,		6,04
11	Polemonium coeruleum L.	0,1	0,9	22.222	5,60
12	Gratiola ofifcinalis L.	0,1	0,8	2.500	5,25
13	Lamium album L.	1	0,3	666	5,81
14	Calendula officinalis L.	0,1	0,3	6.666	5,44

CONCLUZII

1. Am izolat și determinat gravimetric, conținutul în saponine triterpenice de la 14 specii medicinale indigene. Majoritatea speciilor studiate prezintă un conținut ridicat de saponine.

2. Prin analiză cromatografică în strat subțire am stabilit numărul saponozidelor pentru fiecare specie, a sapogeninelor rezultate în urma hidrolizei și am identificat gipsogenina, acidul quilaic și oleanolic din unele specii.

3. Am determinat indicele hemolitic, a cărui valoare diferă în funcție de specia de la care provine saponina.

Prezentat la redacție
la 8 iunie 1977

Facultatea de Farmacie Cluj-Napoca
Disciplinele de Botanică și Farmacognozie.

INVESTIGATIONS ON TRITERPENOID SAPONINS IN MEDICINAL INDIGENOUS PLANTS

SUMMARY

The triterpenoid saponins of 14 medicinal plants were isolated and the content was gravimetrically estimated.

The qualitative study of saponosides and their sapogenins was achieved by chromatographic analysis. In addition, the haemolytic index of isolated saponins was determined.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Boiteau, B. Pasich, R. A. Ratsimamanga, *Les tripterpenoides en physiologie animale et vegetale.* Gauthier Willers ed. Paris 1964.
2. L. Köfler, *Die Saponine*, Springer Verlag, Wien 1927.
3. Th. Solacolu, Ecat. Macovei-Weles, Arch. Pharm. **271**, 470 (1933).
4. Evd. Coiciu, G. Racz, *Plante medicinale și aromatice.* Ed. Acad. R.P.R., București 1962.
5. Elena Barza, I. Ciulei, Farmacia **22**, 499 (1974).
6. Viorica Cucu, Lucia Grecu, Farmacia **19**, 641 (1971).
7. K. Hiller, M. Keipert, B. Linzer, Pharmazie **21**, 713 (1966).
8. D. K. Iuhanonov, I. N. Sokalski, Rastit, resursi **7**, 386 (1971).
9. D. K. Iuhanonov, L. A. Sapunova, Rastit. resursi **12**, 244 (1976).
10. N. V. Titin (red.), *Atlas lekarstvenih rastenii ASSR.* Gos. Izd. Med. Lit. Moskva 1962.
11. * * * *Flora* R.S.R. vol. I—X. Ed. Acad. RSR, București 1952—1965.
12. R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart. Bd. 3 (1966), Bd. 5 (1969).
13. N. R. Farnsworth, J. Pharm. Sci. **55**, 255 (1966).
14. E. Stahl, *Chromatographische und mikroscopische Analyse von Drogen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1970.
15. Lucia Grecu, *Studiul farmacognostic al unor specii de Primula din R.S.R.* Teză de doctorat IMF Cluj-Napoca 1973.
16. R. Tschetsche, A. Ausch, Chem. Ber. **85**, 1067 (1952).
17. G. Vogel, Planta med. **11**, 362 (1963).
18. Lucia Grecu, Viorica Cucu, Farmacia **23**, 167 (1975).
19. Th. Kartnig, O. Wegschaider, Planta med. **21**, 144 (1972).
20. * * * *Dyeing reagents for thin layer and paper Chromatography.* E. Merck, Darmstadt 1974,

CAROTINOIDE DIN INSECTE. V*
CAROTINOIDE DIN OUĂ, LARVE ŞI INSECTE ADULTE *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* (fam. *Coccinellidae*)

V. TĂMAŞ+, V. CIURDARU+, K. L. SIMPSON+ şi T. PERJU++

Rezumat. Au fost cercetate carotinoidele din ouă, larve şi insecte adulte de *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*. Au fost identificate aceleaşi tipuri de carotinoide ca şi în frunzele de lucernă cu care se hrănesc insectele. În larve şi în insecte adulte s-a constatat o acumulare de epoxicarotinoide (5,6-epoxi-luteină, violaxantină, anteraxantină şi neoxantină). Anteraxantina a fost identificată numai în insecte adulte.

În continuarea cercetărilor noastre cu privire la pigmenţii carotinoidici din insecte dăunătoare plantelor agricole (1, 2, 3, 4) s-a analiza conţinutul şi natura carotinoidelor din ouă, larve şi insecte adulte de *Subcoccinella viginquatuorpunctata*, comparativ cu planta-gazdă *Medicago sativa*. Insectele *S. vigintiquatuorpuncta* sînt de răspîndire sporadică în unele ţări din Europa (5), Asia (6) şi nordul Africii (5). În Europa au fost semnalate în Bulgaria (7), Cehoslovacia (8), Jugoslavia (8), Polonia (8) şi România (5, 9). În ţara noastră aceste insecte apar uneori în masă, mai ales în regiunile de stepă şi silvostepă (9).

Ouăle şi larvele de *S. vigintiquatuorpunctata* au culoare galben-deschisă. Ouăle sînt dispuse pe partea inferioară a frunzelor. Insectele adulte au culoare roşcată, iar elitrele lor au 24 puncte roşii. Adulţii se hrănesc cu aparatul foliar al diferitelor plante leguminoase (*Medicago spp., Trifollium spp., Genista spp., Galega spp.)* şi al *Chenopodiaceelor* şi *Caryophilaceelor*. Insectele desprind ţesuturile frunzelor, le presează şi apoi extrag sucul celular. Ţesuturile astfel presate rămîn lipite de limbul foliar. Frunzele atacate capătă un aspect reticulat, se răsucesc şi se usucă. Pagube mari produc larvele îndeosebi cele din generaţia a doua la coasa a doua şi a treia de lucernă.

MATERIAL ŞI METODĂ

Recoltarea materialului. Ouăle au fost desprinse de pe frunze cu ajutorul unui bisturiu. Larvele au fost crescute în vase de sticlă prin incubarea ouălor depuse pe plantele de lucernă.

Extracţia pigmenţilor carotinoidici. Carotinoidele din frunze de lucernă, din ouă, larve şi insecte adulte de *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* au fost extrase după metode cunoscute

* Lucrarea face parte din Programul comun de cercetare al Institutului agronomic, Cluj-Napoca, România şi Universităţii Rhode Island, Kingston, USA

+ Pentru partea biochimică

++ Pentru partea entomologică

și prezentate în lucrări anterioare (1,2,3,4,10,11). Extractele au fost saponificate cu KOH 15% etanolic, la temperatura camerei, timp de două ore (3, 4, 10, 11).

Separarea cromatografică. Pigmenții carotinoidici din amestec au fost separați prin cromatografiere în strat subțire de silicagel G. Sistemele de developare utilizate au fost diferite, iar zonele de pigmenți de pe cromatoplăci au fost extrase cu amestec de eter de petrol și etanol sau cu etanol. Valorile Rf ale pigmenților au fost comparate cu standarte autentice.

Identificare. Pentru identificarea carotinoidelor s-au înregistrat spectrele de absorbție, utilizînd în spectrofotometru VSU—1 Zeiss, s-au făcut cocromatograme cu pigmenți autentici, s-a efectuat repartiția hipofazică între eter de petrol și metanol 95% și s-a făcut reacția specifică pentru epoxicarotinoide (3,4).

Determinări cantitative. Determinările cantitative ale carotinoidelor s-au făcut spectrofotometric, utilizînd valori $E^{1\%}_{1cm}$ cunoscute ale fiecărei carotinoide (1,13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Natura și cantitatea totală de carotinoide separate din ouă, larve și insecte adulte de *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*, precum și din frunzele proaspete de lucernă sînt redate în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul total de carotinoide în ouă, larve și insecte adulte *Subcocinella vigintiquatuorpunctata* **(fam.** *Coccinelidae*, **Ord.** *Coleoptera*) **în frunze de lucernă**

Pigmenți din	g/g material proaspăt	max.	Solvent	$E^{1\%}_{1cm}$
Ouă	3,60	450	Eter de petrol	2 505
Larve	86,80	450	Eter de petrol	2 505
Insecte adulte	602,80	450	Eter de petrol	2 505
Frunze de lucernă	968,00	450	Eter de petrol	2 505

Din datele prezentate în tabela 1 reiese faptul că ouăle sînt relativ sărace în carotinoide, mai bogate fiind insectele adulte. Larvele conțin o cantitate de carotinoide de aproximativ 24 de ori mai mare decît ouăle, iar insectele de peste 200 de ori.

Tabela 2

Natura și proporția relativă a carotinoidelor în frunze de lucernă, ouă, larve și insecte adulte *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*

Carotinoide	Proporția relativă (în %) în:			
	Frunze de lucernă	Ouă	Larve	Insecte adulte
α-Carotină	1	—	—	—
β-Carotină	35	25	20	18
Criptoxantină	5	4	3	0,3
Pigment de culoare roz (neidentificat)	—	—	—	1
Luteină	46	55	50	40
5,6-Epoxiluteină	5	5	9	14
Zeaxantină	2	—	—	—
Violaxantină	5	6	10	12
Anteraxantină	—	—	—	5,7
Neoxantină	3	4	8	9

În ceea ce privește natura carotinoidelor găsite în funzele de lucernă se regăsesc în ouă, larve și insecte *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata.*

Acest fapt denotă că insectele *Subcoccinella v.* sînt capabile doar de a depozita carotinoidele luate din planta-gazdă, fără a le putea metaboliza, respectiv a le converti în cetocarotinoide, aşa cum se petrece în cazul altor insecte. Totuşi, din rezultatele redate în tabela 2 reiese faptul că în larve şi îndeosebi în insecte se află cantităţi relativ mari de epoxicarotinoide (5, 6-epoxiluteină, violaxantină, anteraxantină şi neoxantină), a căror procent se ridică la peste 40%. Astfel, în insecte a fost identificată anteraxantina, pigment ce nu a fost identificat în planta-gazdă, în ouă şi în larve. De asemenea, conţinutul în 5, 6-epoxiluteină şi violaxantină este mai ridicat în larve şi în insecte adulte decît în ouă. Acest fapt demonstrează capacitatea de epoxidare a carotinoidelor de către insectele *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata.*

În concluzie, insectele *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* acumulează carotinoidele luate din planta-gazdă şi convertesc luteină şi zeaxantină în epoxizii lor.

Prezentat la redacţie
la 14 iulie 1977

Catedra de biochimie din Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca, România
Department of Food Science and Technology, University of Rhode Island, Kingston, USA

INSECT CAROTENOIDS. V. CAROTENOIDS FROM EGGS, LARVAE AND BEETLES OF *SUBCOCCINELLA VIGINTIQUATUORPUNCTATA*

SUMMARY

The carotenoids from eggs, larvae and beetles of *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* were investigated. In the eggs, larvae and beetles the same types of carotenoids with those in plants of *Medicago sativa* have been identified. In the larvae and beetles stored epoxycarotenoids (5, 6-epoxilutein, violaxanthin, anteraxanthin and neoxanthin). Anteraxanthin was identified only in beetles.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Tămaş, T. Perju, St. cerc. biochim., **19**, 121 (1976).
2. V. Tămaş, V. Ciurdaru, T. Perju, St. cerc. biochim., **19**, 209 (1976).
3. V. Tămaş, V. Ciurdaru, K. L. Simpson, T. Perju, St. cerc. biochim (sub tipar).
4. V. Tămaş, V. Ciurdaru, K. L. Simpson, T. Perju, St. cerc. biochim. (sub tipar).
5. C. Manolache, Gh. Boguleanu, *Entomologie agricolă*, Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1967.
6. K. P. Yang, Rev. app. ent., **55**, 172 (1967).
7. V. Popova, Rast. Nauki, **3**, 69 (1966).
8. N. Tanasijevic, Zbornik Matiţe Srpske, **16**, 19 (1959).
9. C. Hrisafi, M. Ionescu, *Dăunătorii plantelor de nutreţ*, Editura Agrosilvică, Bucureşti, 1961.
10. A. Veerman, Comp. Biochem. Physiol., **48 B**, 321 (1974).
11. J. Feltwell, M. Rothschild, J. Zool., Lond., **174**, 1 (1974).
12. T. W. Goodwin, Chemistry of Biochemistry of Plant Pigments, Academic Press London New York San Francisco, vol. 2, 1976.

CERCETĂRI PRIVIND UNELE ASPECTE BIOCHIMICE ALE LANŢULUI TROFIC DINTRE *CINARA PICEAE* P. ŞI *FORMICA RUFA* L. DE PE MOLID

TEODORA VÂLSĂNESCU, DINU PARASCHIVESCU, STELIANA ICHIMESCU

Rezumat. S-au efectuat analize comparative asupra conţinutului în glucide şi aminoacizi liberi al lachnidelor, furnicilor şi mierei de mană faţă de seva molidului. S-a constatat prezenţa unor elemente comune, evidenţiind astfel trăsături noi al relaţiei trofice Formicidae, Lachnidae, Apinae.

Într-o lucrare anterioară (5) s-a iniţiat un studiu biochimic asupra conţinutului în glucide al mierei de mană (pădure) produs al cărui conţinut în substanţe nutritive (glucide şi aminoacizi) este dependent de existenţa lanţului trofic Formicidae, Lachnidae, Apinae (1). În continuarea cercetării aspectelor biochimice ale lanţului trofic amintit s-au analizat glucidele şi aminoacizii liberi în componentele respective: seva molidului, corpul lachnidelor, guşilor furnicilor şi mierea de pădure. S-a urmărit găsirea unor elemente comune, care ar putea constitui un indiciu că substanţele nutritive din seva molidului ajung în guşile furnicilor şi mierea de pădure prin intermediul lachnidelor.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările noastre s-au efectuat într-o zonă forestieră din Munţii Bucegi (Carieră) la o altitudine de 1.100 m. Cuibul de furnici aparţinea speciei *Formica rufa* L., specie de furnică roşie de pădure, valoroasă din punct de vedere economic (3). În apropierea cuibului cu cupolă au fost cercetaţi săptămînal, 10 molizi tineri (2-2,5 m înălţime) în perioada aprilie—noiembrie 1977.

Coloniile de păduchi de plante (*Cinara piceae* P.) au fost etichetate încă din luna aprilie, cînd a început colectarea probelor pentru analizele biochimie.

Probele au fost prelucrate astfel:

1. Lachnidele au fost majorate cu un volum mic de apă distilată, extractul s-a diluat cu un volum egal de alcool şi soluţia limpede, rezultată prin filtrare. S-a aplicat pe cromatograme.

2. Guşile furnicilor au fost separate din corpul acestora la binocular, după fixare în poziţie ventrală, în capsule Petri.

Prepararea soluţiei pentru analiza cromatografică s-a făcut prin procedeul folosit în cazul lachinidelor concentraţia fiind de 50 guşi/ml.

3. Ramurile de molid s-au majorat fin şi s-au extras cu alcool diluat, 70%. Soluţiile au fost concentrate la volum mic, decolorate cu cărbune, filtrate şi aduse la un volum cunoscut pentru a fi aplicate pe cromatograme.

4. Probele de miere au fost diluate cu apă distilată 1/10.

Glucidele şi aminoacizii liberi din soluţiile preparate — după cum s-a arătat mai sus — s-au separat prin cromatografie pe hîrtie. În toate cazurile s-a folosit aceeaşi metodă; tehnica descendentă, solvent butanol/ac. acetic/apă (150/30/70). Timpul de migrare a fost de 48 h pe hîrtie MN 261.

St. cerc. biochim., 21, (1), 99—102, (1978)

Reactivul folosit pentru punerea în evidenţă a glucidelor a fost soluţia difenil-amină/ anilină/ ac. fosforic. Pentru determinările cantitative s-a folosit metoda Dimler (2) avînd ca reactiv pentru determinarea colorimetrică, antrona.

Pentru aminoacizi, revelarea s-a făcut cu ninhidrină, iar determinarea cantitativă s-a făcut colorimetric cu reactivul Barrollier (4).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-au analizat probe recoltate în perioada aprilie-octombrie din toate speciile componente ale lanţului trofic amintit şi două probe miere de mană.

Se observă o continuitate a componentelor glucidice şi a aminoacizilor de la seva molidului la guşile furnicilor şi mierea de mană avînd ca verigă intermediară lachnidele (fig. 1, 2).

Conţinutul în glucide şi aminoacizi liberi este mai bogat în lunile de primăvară, rămîne aproape constant în lunile de primăvară şi prezintă o tendinţă de scădere în lunile de toamnă (tabela 1, 2).

Tabela 1

Conţinutul în aminoacizi liberi ai sevei de molid *(Picea excelsa)* **g/100 g ramuri uscate**

Nr. crt.	Proba	Arginină	Glicină	Ac. glutamic	Alanină	Triptofan	Valină	Leucină
1	aprilie	—	—	—	—	5	—	—
2	mai	5	15	5	20	15	5	15
3	iunie	50	10	15	15	10	—	—
4	iulie	50	15	20	20	10	—	—
5	august	5	5	5	5	25	5	—
6	septembrie	5	5	5	5	20	5	—
7	octombrie	—	5	10	—	—	—	—

Diferenţele cantitative observate la elementele respective din seva molidului şi dependente de perioada de vegetaţie se reflectă şi în aspectul cantitativ al acelorași elemente în guşile furnicilor (tabela 3, 4).

Lachnidele şi mierea de mană au fost analizate numai calitativ pentru evidenţierea lanţului trofic, concentraţia în aminoacizi liberi a acestor probe fiind foarte mică.

Tabela 2

Conţinutul în glucide al sevei de molid *(Picea excelsa)* **g/100 g ramuri uscate**

Nr. crt.	Proba	Glucoză	Fructoză	Zaharoză
1	aprilie	260	70	30
2	mai	350	50	—
3	iunie	180	35	—
4	iulie	200	35	—
5	august	150	20	—
6	septembrie	130	20	—
7	octombrie	80	45	20

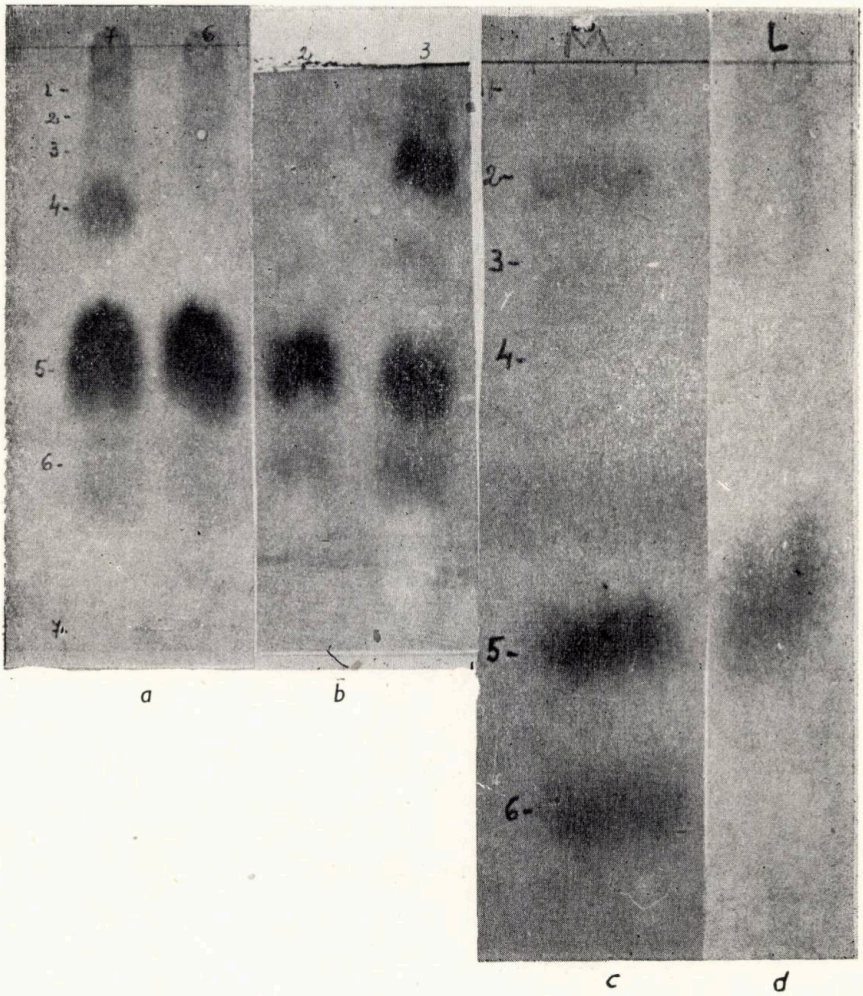


Fig. 1 — *Aspectul cromatografic al glucidelor*

a. Seva molidului : 1) rafinoză ; 2) melicitoză ; 3) lactoză ; 4) zaharoză ; 5) glucoză ; 6) fructoză ; 7) xiloză.
b. Guși de furnici : 1) rafinoză ; 2) melicitoză ; 3) lactoză ; 4) zaharoză ; 5) glucoză ; 6) fructoză ;
c. Mierea de pădure: 1) rafinoză ; 2) melicitoză ; 3) lactoză ; 4) zaharoză ; 5) glucoză ; 6) fructoză.
d. Lachnide: 1) rafinoză ; 2) melicitoză ; 3) lactoză ; 4) zaharoză ; 5) zaharoză ; 6) fructoză.

Se observă prezența polizaharidelor în apropierea liniei de start.

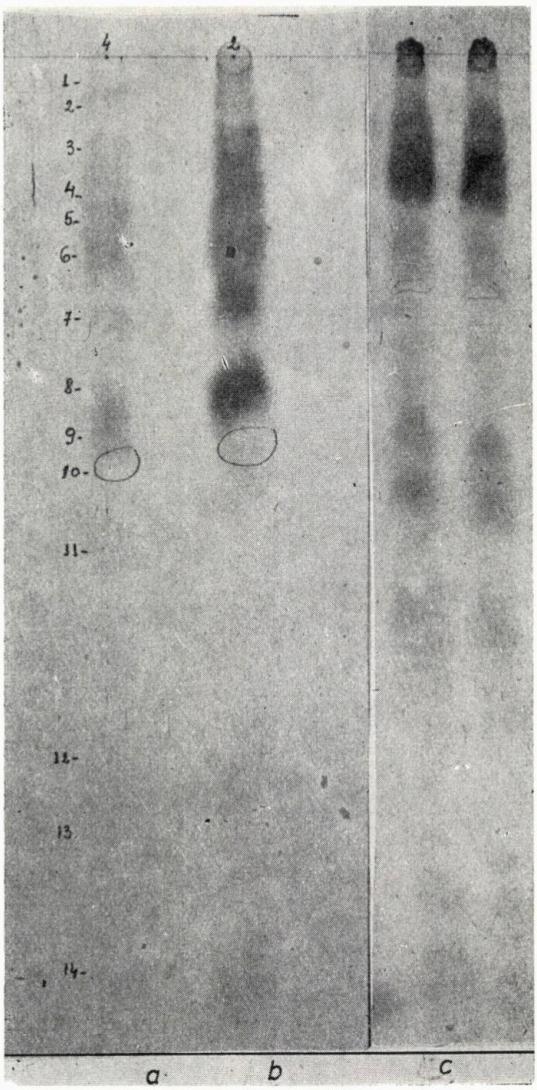


Fig. 2 — *Aspectul cromatografic al aminoacizilor liberi*

a. Lachnide: 1) cistină; 2) lizină; 3) histidină; 4) arginină; 5) glicocol; 6) serină; 7) acid aspartic; 8) acid glutamic; 9) alanină, 10) prolină; 11) acid amino butiric; 2) valină; 13) fenilalanină; 14) leucină.

b. Guşi de furnici: Idem, concentraţii diferite.

c. Seva molidului. 1) cistină; 2) lizină; 3) histidină; 4) arginină; 5) asparagină; 6) glicocol; 7) serină; 8) glutamină; 9) acid aspartic; 10) acid glutamic; 11) alanină; 12) prolină; 13) tirozină; 14) acid amino butiric; 15) cisteină, 16) triptoafan; 17) valină; 18) fenilalanină; 19) leucină.

Se observă pe toate cromatogramele prezenţa peptidelor.

Tabela 3

Conținutul în aminoacizi liberi al gușilor de furnici *(Formica rufa)* g/ml soluție extractivă din 50 uși

Nr. crt.	Proba	Glicocol	Ac. asp.	Ac. glut.	Alanină	Ac. am. but.	Valină	Leucină
1	14 aprilie	5	15	15	10	—	—	5
2	12 mai	50	40	40	20	15	20	10
3	14 iunie	30	45	40	30	5	5	25
4	13 iulie	30	35	20	20	10	10	10
5	20 iulie	20	30	25	20	5	5	5
6	5 august	10	20	20	25	5	—	—
	20 august							
7	10 sept.	25	40	30	30	10	5	5
8	9 oct.	30	40	40	30	10	5	5

Tabela 4

Conținutul în glucide al gușilor de furnici *(Formica rufa)* g/ml soluție extractivă din 50 guși

Nr. crt.	Proba	Glucoză	Fuctuoză	Zaharoză
1	14 aprilie	35	20	—
2	12 mai	50	20	—
3	14 iunie	120	35	30
4	13 iulie	40	10	—
5	20 iulie	45	10	—
6	5 august	60	20	—
	20 august			
7	10 septembrie	130	25	—
8	9 octombrie	30	20	—

Aminoacizii liberi sînt însoțiți de peptide solubile, cu greutate moleculară mică, începînd cu seva molidului și terminînd cu gușile furnicilor și mierea de mană, trecînd deci prin corpul lachnidelor fără a suferi modificări (ex. hidroliză enzimatică) (fig. 2).

Se observă o mare asemănare, aproape identitate, între lachnide și furnici în ce privește aspectul calitativ al conținutului în glucide și aminoacizi liberi.

Din datele prezentate mai sus asupra cercetărilor privind analiza elementelor nutritive comune lanțul trofic *Formicidae-Lachnidae-Apinae*, rezultă continuitatea glucidelor și aminoacizilor liberi din seva molidului în mierea de pădure, indiciu că albinele se hrănesc cu mana depusă de lachnide (*Cinara piceae P.*), specie ce joacă rol de furnizor de hrană; lachnidele fac accesibilă seva molizilor atît albinelor cît și furnicilor, protectoarele coloniilor de lachnide în toate fazele de dezvoltare ale acestora. Se formează astfel lanțul trofic *Formicidae-Lachnidae-Apinae*, foarte important pentru producerea mierei de mană (pădure).

Corelarea conținutului în glucide și aminoacizi liberi din lachnide și furnici cu conținutul diferit al sevei molidului, dependent de perioada de vegetație, prezența unor elemente nutritive comune ce rămîn intacte pînă în miere, confirmă existența acestui lanț trofic în natură și rolul lachnidelor ca verigă de legătură între regnul vegetal și cel animal.

CONCLUZII

1. S-a constatat existenţa unor elemente comune în compoziţia chimică a sevei molidului, lachnidelor (*Cinara piceae* P.), guşilor furnicilor (*Formica rufa* L.).

2. Componentele studiate au fost glucidele şi aminoacizii liberi, separate cromatografic şi analizate calitativ şi cantitativ.

3. Modificările în compoziţia sevei molidului, determinate de perioada de vegetaţie, se reflectă în compoziţia calitativă şi cantitativă a glucidelor şi aminoacizilor liberi din toate verigile lanţului trofic.

4. Prezenţa polizaharidelor şi peptidelor din seva molidului în guşile furnicilor şi chiar în mierea de mană arată că ele nu suferă transformări enzimatice la trecerea prin corpul lachnidelor.

Prezentat la redacţie
la 26 noiembrie 1977

Institutul de ştiinţe biologice
Colectivul de ecologie Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. I. Cirnu, *Mierea de mană*, Editura Apimondia, Bucureşti, 1971.
2. I. M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Ed. tehnică, Bucureşti, 1960.
3. W. Kloft, A. Maurizio, W. Kaeser, *Das Waldhönigbuch*, Ehrenwirth Verlag, München, 1965.
4. E. Lederer, *Chromatographie en chimie organique et biologique*, vol. II, Masson et C-ie Eds., 1960.
5. D. Paraschivescu, St. Cerc. Biochim., **18**, 129 (1975).

CERTAIN BIOCHEMICAL ASPECTS OF NUTRITION RELATIONSHIP BETWEEN *CINARA PICEAE* P. (LACHNIDAE) AND SPRUCE-FIR *FORMICA RUFA* L. (FORMICIDAE)

SUMMARY

Comparative investigations on carbohydrates and amino acids contents in Lachnidae, Formicidae and mildew honey as compared with spruce-fir juice revealed the presence of several identical compounds and pointed out a number of new aspects concerning nutrition relationships in the Formicidae-Lachnidae-Apinae chain.

PRODUCEREA CELULAZELOR ÎN TULPINI ŞI MUTANTE DE *ASPERGILLUS NIGER* CULTIVATE ÎN PREZENŢA UNOR SURSE DIFERITE DE AZOT ŞI CARBON

M. ZAMFIR-GRIGORESCU, S. VASU

Rezumat. Tulpinile sălbatice şi mutante de *Aspergillus niger*, cultivate în prezenţa diferitelor surse de azot şi carbon, se diferenţiază între ele ca producţie de miceliu şi celulaze intra- şi extracelulare. NH_4^+ influenţează favorabil producţia şi eliberarea extracelulară a celulazelor, iar NO_3^- şi cazaminoacizii determină scăderea producţiei şi eliberării extracelulare a acestor enzime. Creşterea mai abundentă a miceliului în prezenţa diglucidelor nu este însoţită în toate cazurile de o activitate celulazică mare. Mutanta *Aspergillus niger* G_2-75, în prezenţă de NH_4^+ şi zaharoză sau glucoză indică cea mai mare activitate celulazică extracelulară.

Celulazele produse în diferite microorganisme (1), bacterii şi fungi (2) (3) au fost studiate pentru interesul pe care îl prezintă aceste enzime în diferite ramuri ale industriei alimentare, chimice, a lemnului (2) şi hîrtiei (4), pentru protecţia fondului forestier, degradarea biologică a deşeurilor celulozice, prevenirea degradării fibrelor textile (5) etc. *Aspergillus niger* (4), *Curvularia lunata* (6), *Trichoderma viride* (3) şi alte microorganisme au fost folosite pentru obţinerea de preparate cu acţiune celulolitică. În sensul celor menţionate ne-am preocupat şi noi (7) de selectarea unor tulpini şi mutante de *A. niger*, cu activitate celulazică apreciabilă. În cele ce urmează prezentăm rezultatele obţinute privind efectul diferitelor surse de azot şi carbon asupra producerii celulazelor în unele tulpini şi mutante de *A. niger*.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit tulpinile sălbatice. *A. niger* ICA—34 (colecţia ICICA — Bucureşti) şi *A. niger* G_2 (colecţia ISB — Bucureşti), precum şi unele mutante selectate în urma iradierii sporilor cu raze gama (8).

Condiţiile de cultivare şi prelucrare a culturilor. Culturile de *A.niger* au fost obţinute prin agitare rotativă, la 150 rot/min, la +28°C, în baloane Erlenmeyer de 750 ml, care conţineau cîte 150 ml mediu Raulin (9) sau acesta modificat prin folosirea diverselor surse de azot şi carbon; mediile de cultură au fost sterilizate 30 min la 0,5 atm, fiind apoi însămînţate cu $6 \cdot 10^6$ spori.

S-au folosit glucoză, maltoză (Merck), zaharoză, celuloză (Serva), DEAE-celuloză (Whatman) şi CM-celuloză (Austranal) ca surse principale de carbon, şi $(NH_4)_2HPO_4$, $NaNO_3$ (Merck) şi cazaminoacizii (Difco) ca surse de azot în echivalenţii lor corespunzători mediului Raulin (9).

Miceliul în vîrstă de 3—4 zile a fost separat de mediul de cultură prin filtrare pe pînză de nylon, spălat repede cu apă distilată şi uscat cu hîrtie de filtru. Mediul de cultură şi apele de spălare s-au adus la 200 ml, constituind lichidul de cultură pe care se determina activitatea enzimatică. Miceliul uscat a fost folosit parţial pentru determinarea greutăţii uscate(+ 105°C,) şi parţial pentru obţinerea de omogenate 10%.

Omogenatele s-au obţinut prin majorarea miceliilor cu nisip de cuarţ, la rece, în apă distilată, după 18—20 ore s-a centrifugat la 4 000 rot/min, 10 min, supernatantul fiind folosit pentru determinarea activităţii intracelulare.

Determinarea activităţii celulazelor s-a efectuat şi exprimat în unităţi după indicaţiile date de Muller, Blum, Glennonx şi Burton (10), la pH 4,5 (4).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru urmărirea producerii celulazelor în prezenţa diferitelor surse de azot şi carbon au folosit tulpinile sălbatice *A. niger* ICA—34 şi G_2, respectiv mutantele G_2—15 şi G_2—75 selecţionate în urma iradierii sporilor cu raze gama şi care faţă de alte mutante analizate (7) prezenta o activitate celulazică extracelulară mai mare. Aceste tulpini şi mutante se diferenţiază între ele atît ca activitate celulolitică cît şi ca producţie de miceliu (tabela 1 şi 2); cultivate pe mediu Raulin tulpinile sălbatice indică o activitate celulolitică mai mică, faţă de mutantele folosite, a căror activitate este de cca 1,5 — 4 ori mai mare.

Tabela 1

Influenţa sursei de azot asupra producerii celulazelor în culturile de *A. niger* (unit./g. miceliu uscat)

A. niger	Sursa de azot	Miceliu uscat (g)	Activitate celulazică	
			intracelulară	extracelulară
ICA—34	Mediu Raulin	2,14	2,50	1,40
	$(NH_4)_2HPO_4$	2,20	1,28	1,72
	$NaNO_3$	1,08	0,15	1,29
	Cazaminoacizi	2,63	0,0	1,51
G_2	Mediu Raulin	1,77	1,27	2,09
	$(NH_4)_2HPO_4$	1,11	0,27	4,50
	$NaNO_3$	0.47	5,31	3,00
	Cazaminoacizi	1,80	0,0	1,22
G_2—15	Mediu Raulin	1,20	0,0	9,13
	$(NH_4)_2HPO_4$	0,95	1,42	20,0
	$NaNO_3$	0,47	5,31	3,0
	Cazaminoacizi	1,16	0,28	1,20
G_2—75	Mediu Raulin	1,80	0,0	3,13
	$(NH_4)_2HPO_4$	0,73	0,53	15,06
	$NaNO_3$	1,67	0,75	0,34
	Cazaminoacizi	1,84	0,0	1,58

Diferitele surse de azot utilizate (în cantităţi corespunzătoare conţinutului în azot al mediului Raulin), influenţează în mare măsură producţia de miceliu şi de celulaze (tabela 1).

Astfel, cele două tulpini sălbatice şi mutantele analizate, cultivate în prezenţa ionilor de amoniu se comportă diferit. Socotind drept martor culturile obţinute pe mediu Raulin, creşterea miceliului şi producţia de celulaze în cazul tulpinii ICA—34 este puţin influenţată de utilizarea ionilor de amoniu ca singură sursă de azot; în schimb tulpina G_2 şi mutan-

tele corespunzătoare G_2—15 și G_2—75 cu toate că produc o cantitate mai mică de micelii, manifestă o activitate celulazică mai mare.

Ionii de amoniu, în cazul acestora din urmă, influențează favorabil nu numai producția de celulaze, care crește de cca 2—2,5 ori, ci și eliberarea lor extracelulară.

Tabela 2

Influența sursei de carbon asupra producerii celulazelor în culturile de *A. niger* (unit./g micelii uscat)

A. niger	Sursa de carbon	Miceliu uscat (g)	Activitate celulazică	
			intracelulară	extracelulară
ICA—34	Glucoză	1,04	1,0	2,21
	Maltoză	1,12	0,22	1,20
	Zaharoză	0,77	0,0	3,40
	Celuloză	0,2	0,0	0,0
	DEAE-celuloză	0,06	0,0	0,0
	CM-celuloză	0,06	0,0	18,20
G_2	Glucoză	0,62	1,60	25,50
	Maltoză	0,79	0,25	25,50
	Zaharoză	0,89	0,21	7,0
	Celuloză	0,31	0,0	0,0
	DEAE-celuloză	0,04	0,0	0,0
	CM-celuloză	0,04	0,0	0,0
G_2—15	Glucoză	0,95	2,40	1,47
	Maltoză	1,45	0,06	5,37
	Zaharoză	0,67	0,0	4,40
	Celuloză	0,43	0,0	0,0
	DEAE-celuloză	0,09	0,0	0,0
	CM-celuloză	0,04	—	0,0
G_2—75	Glucoză	0,66	2,00	49,30
	Maltoză	1,04	0,19	13,65
	Zahariză	0,73	0,59	54,90
	Celuloză	0,33	0,0	0,0
	DEAE-celuloză	0,08	0,0	0,0
	CM-celuloză	0,05	2,60	0,0

Folosirea $NaNO_3$, ca sursă de azot duce la scăderea producției de miceliu și de celulaze și totodată afectează negativ eliberarea extracelulară a acestor enzime. În prezența azotaților *A. niger* ICA—34, G_2 și G_2—15 produc doar cca jumătate, sau mai puțin decît jumătate din miceliul produs pe mediul Raulin, iar producția de celulaze din cultura G_2—75 este mult mai scăzută, cu toate că creșterea miceliului în cazul acestei mutante este puțin influențată de ionul azotat.

Cazaminoacizii, folosiți ca sursă de azot, nu influențează în mare măsură creșterea miceliului de *A. niger*; în schimb, determină o scădere a activității celulolitice. Această scădere a celulazelor este de cca 50% în cazul *A. niger* ICA—34, G_2 și G_2—75 și este mult mai accentuată — de peste 90% — pentru mutanta G_2—15.

Utilizarea preferențială a surselor de azot anorganic pentru producerea celulazelor de către *A. niger*, ca și favorizarea eliberării lor extracelulare în prezența sărurilor de amoniu sînt în concordanță cu rezultatele

obţinute şi în cazul producerii şi eliberării extracelulare a enzimelor pectolitice (11) (12) (13), proteazelor (14), ribonucleazelor (15) etc., în culturile de *Aspergillus*. Menţinînd constantă compoziţia mediului Raulin şi folosind ca singură sursă de azot — $(NH_4)HPO_4$ (care favorizează producerea şi eliberarea extracelulară a celulazelor) —, am cultivat tulpinile şi mutantele de *A. niger* pe de o parte în prezenţa unor mono- şi diglucide şi pe de altă parte în prezenţă de celulază şi celuloze substituite. În aceste condiţii, după cum rezultă din tabela 2, creşterea miceliului şi producţia de celulaze este influenţată de glucidele folosite ca principală sursă energetică şi de carbon.

În general, miceliul de *A. niger* creşte mai abundent în prezenţa diglucidelor, în special pe maltoză (ICA—34, G_2—15 şi G_2—75) sau zaharoză (G_2). Creşterea mai abundentă a miceliului nu este întotdeauna însoţită şi de o activitate celulazică mai mare. Aşa de exemplu mutanta G_2—75, cultivată în prezenţă de zaharoză sau glucoză, prezintă o activitate celulazică superioară, de 3—4 ori mai mare decît cea obţinută în prezenţă de maltoză. Similar se comportă şi tulpina sălbatică G_2, care creşte bine pe medii ce conţin zaharoză. În prezenţă de zaharoză, activitatea celulazică manifestată de această tulpină însă de cca 3,5 ori mai mică decît activitatea obţinută în prezenţă de glucoză şi maltoză, pe care G_2 produce o cantitate mai mică de miceliu.

Creşterea miceliului de *A. niger* pe celuloză este în general slabă (tabela 2), dar este de cel puţin 3 ori mai abundentă decît pe celulozele substituite — DEAE — şi CM-celuloză. Din acest punct de vedere tulpinile şi mutantele folosite s-ar împărţi în două tipuri: cu creşterea indiferentă faţă de felul celulozei, indicînd o creştere asemănătoare a miceliului pe DEAE şi CM-celuloză — cum sînt tulpinile sălbatice ICA—34 şi G_2, şi cu creşterea dependentă de tipul de celuloză şi anume mai bună pe DEAE-celuloză şi mai slabă pe CM-celuloză — ca în cazul mutantelor G_2—15 şi G_2—75.

Producţia de celulaze pe medii de cultură care conţin celuloze este în general nulă, cu două excepţii: ICA—34 pe mediu cu CM-celuloză manifestă o activitate celulazică, extracelulară, apreciabilă şi mutanta G_2—75, care tot în prezenţă de CM—celuloză manifestă o oarecare activitate celulazică, însă în acest caz intracelulară. Ar fi posibil ca lipsa activităţii celulazice, constatată în majoritatea culturilor obţinute în prezenţa celulozelor, să fie datorată nu absenţei acestor enzime, ci probabil absorbţiei lor pe tipurile de celuloze folosite. Aceasta cu atît mai mult cu cît două din celulozele folosite sînt schimbătoare de ioni, iar a treia este un produs „denaturat" care ar putea să manifeste proprietăţi absorbante, de felul celor pe care le-am constatat în cazul celofanului — o hidrat-celuloză —, capabilă de a fixa celulazele din lichidele de cultură de A. niger.

CONCLUZII

1. Tulpinile şi mutantele de *A. niger* analizate, se diferenţiază între ele ca producţie de biomasă şi celulaze în prezenţa diferitelor surse de azot şi carbon folosite.

2. În general, NH_4^+ influențează favorabil producția și eliberarea extracelulară a celulazelor iar gruparea NO_3^- și cazaminoacizii determină scăderea producției și eliberarea extracelulară a acestor enzime.

3. Creșterea mai abundentă a miceliului, în prezența diglucidelor nu este în toate cazurile însoțită de o activitate celulazică mare.

4. Dintre tulpinile și mutantele analizate, A. niger G_2-75 în prezență de NH_3^+ și zaharoză sau glucoză, indică cea mai mare activitate celulazică.

Prezentat la redacție
la 29 septembrie 1977

Institutul de Științe Biologice
Colectivul de acizi nucleici și biosinteza proteinelor

THE PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES IN STRAINS AND MUTANTS OF *ASPERGILLUS NIGER* GROWN IN THE PRESENCE OF DIFFERENT SOURCES OF NITROGEN AND CARBON

SUMMARY

The wild strains and the mutants of *Aspergillus niger* grown in the presence of various sources of nitrogen and carbon differ with respect to the production of mycelium and intra — and extracellular cellulase activity. NH_4^+ enhances the extracellular cellulase activity while the presence of NO_3^- and casaminoacids results in the decrease of the enzyme activity as well as its release in the culture medium. The disaccharides stimulates the growth of the fungus but this is not always associated with a high cellulase activity. The G_2-75 mutant of *Aspergillus niger* grown in the presence of NH_4^+ and saccharose or glucose shown the highest extracellular cellulase activity.

BIBLIOGRAFIE

1. C. C. Selby, K. Haitoland, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 254 (1967).
2. B. Bucht, E. Eriksson, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 135 (1968).
3. G. Petterson, D. L. Eaker, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 154 (1968).
4. C. S. Walseth, Tappi., **55**, 233 (1952).
5. R. J. Dubos, J. Bacteriol., **15**, 223 (1928).
6. J. Comtat, These de Doctorat, 1969.
7. S. Vasu, Vl. Gheordunescu, M. Zamfir-Grigorescu, Dedu Magdalena, Rodica Bîrnescu, Ioana Gomoiu, Date nepublicate, comunicate în Sesiunea anuală de comunicări științifice ICBIOL, aprilie 1976.
8. V. Lazăr, I. Gomoiu, D. Arizan, *Mutante de A. niger izolate în urma iradierii cu raze gama* (lucrare comunicată în Sesiunea științifică a ISB, iunie 1975).
9. A. Jurgensen, *Mikroorganismen der Gärungsindustrie*, Verlag, Hand Carol, Nurenberg, 1956, p. 522.
10. G. L. Miller, R. Blum, W. E. Glennon, A. L. Barton, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
11. S. Vasu, St. cerc. biochim., **4**, 71 (1963).
12. L. A. Hersonova, *Isledovanie protessa obrazovnia pektoliticeskih fermentov pri glubinom cultivirovanii* A. niger, VNIISFL, Moscova, 1965.
13. R. K. Moldobaeva, Mikrobiologia, **37**, 808 (1968)
14. E. Ichishima, Y. Gomi, T. Satarai, F. Yoshida, Agr. Biol. Chem., **27**, 302 (1963).
15. H. Horitzu, Y. Higasaki, H. Tonoyeda, Agr. Biol. Chem., **36**, 933 (1974).

2. In general, NH_4^+ influenced favorably production of cellulases, extracellular and cellular, but repressed NO_3^- and extracellular cellulase production.

3. Cresteria mai abundentă a micelului, în prezența diferitelor surse de azot este cantitatea de substanțe celulazice.

4. Diferențierea micelului este favorizată de prezența NH_4^+ și zaharozei.

Prezentată la redacție ...
la 29 septembrie 1977

Institutul de Științe Biologice
Colectivul de cercetări medicale și biofizică
București

THE PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES IN STRAINS AND MUTANTS OF ASPERGILLUS NIGER GROWN IN THE PRESENCE OF DIFFERENT SOURCES OF NITROGEN AND CARBON

SUMMARY

The wild strains and the mutants of Aspergillus niger grown in the presence of various sources of nitrogen and carbon differ with respect to the production of mycelium and intra — and extracellular cellulase activity. NH_4^+ enhances the extracellular cellulase activity while the presence of NO_3^- and casaminoacids results in the decrease of the enzyme activity as well as its release in the culture medium. The diaccharides stimulates the growth of the fungus but this is not always associated with a high cellulase activity. The G_5-75 mutant of Aspergillus niger grown in the presence of NH_4^+ and saccharose or glucose shown the highest extracellular cellulase activity.

BIBLIOGRAFIE

1. C. C. Selby, K. Haytolakin, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 254 (1967).
2. B. Bucht, E. Eriksson, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 135 (1968).
3. G. Peterson, D. L. Eaker, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 151 (1968).
4. C. S. Wilsertt, Tappi, **55**, 273 (1972).
5. R. J. Duncs, J. Bacteriol., **15**, 223 (1928).
6. J. Comtat, Thèse de Doctorat, 1969.
7. S. Vasu, Vl. Gheorghescu, M. Zaharia-Gheorghescu, Depo Macromolecula, Porca Bibliteca, Iozna Geokoiu, Date reprid cate, comunicate în Sesiunea anuală de comunicări științifice ICBIOL, aprilie 1976.
8. V. Lazăr, I. Ciokoiu, D. Andrian, Mutanți de A. niger izolate în urma tratării cu raze gama (lucrare comunicată în Sesiunea științifică a ISB, iunie 1975).
9. A. Jungersen, Mykotoxpanisaion der Gärungsindustrie, Verlag, Hand Carol, Nurember, 1956, p. 322.
10. G. L. Miller, R. Blum, W. E. Glennon, A. L. Burton, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
11. S. Vasu, Sl. cerc. biochim., **3**, 71 (1963).
12. L. A. Hansonova, Izsledovanie proteza chrezvenia pelkolitscesklà fermenlea pri ylubiteon cellulovoznaji A. niger, VNIISPI., Moscova, 1965.
13. R. K. Molopovskya, Mikrobiologia, **37**, 808 (1968).
14. E. Ichishima, Y. Goni, T. Sadahai, F. Yoshida, Agr. Biol. Chem., **27**, 302 (1963).
15. H. Horitzu, Y. Hirasaki, H. Tonoyeda, Agr. Biol. Chem., **36**, 933 (1974).

REFERAT GENERAL

PRODUCEREA ACIDULUI CITRIC DE CĂTRE *ASPERGILLUS NIGER*. ASPECTE TEORETICE ŞI PRACTICE

CONSTANŢA MUŞOLAN, CORINA IORDACHE, LILICA BOTOŞENEANU, SORIN VASU

Rezumat. Se prezintă un referat asupra producerii acidului citric, atît din punct de vedere teoretic, cît şi aplicativ. Sînt discutate mecanismele biochimice de acumulare a acidului citric şi sînt descrise în linii generale cele trei procedee de fermentaţie aplicate industrial (Koji, în tăvi, submersă).

Acidul citric are o importanţă economică apreciabilă, astfel încît producţia anuală mondială a acestui produs depăşeşte astăzi cifra de 100 000 t. Circa 16% din acidul citric produs se foloseşte în industria farmaceutică. În industria chimică el îşi găseşte aplicaţii în condiţionarea apelor, sau ca plastifiant şi inhibitor al spumării în obţinerea foliilor de vinilin sau a răşinilor poliesterice.

Cererea tot mai mare de acid citric reclamă o preocupare continuă pentru îmbunătăţirea randamentului de obţinere a acestui produs, cu atît mai mult cu cît acest randament este supus deseori unor fluctuaţii apreciabile, în funcţie de o serie de parametri mai mult sau mai puţin controlabili.

În ciuda importanţei economice a producerii acidului citric de către fungul *A. niger*, bazele biochimice ale acestui proces nu sînt încă deplin elucidate. Pe de altă parte, datorită caracterului brevetabil al cercetărilor din acest domeniu, informaţiile privind optimizarea mediului de cultură şi a condiţiilor de fermentaţie sînt relativ puţine şi incomplete.

În cele ce urmează prezentăm cîteva consideraţii asupra mecanismelor biochimice de acumulare a acidului citric, precum şi o serie de date privind procedeele fermentative aplicate industrial pentru obţinerea acestui produs.

MECANISMELE BIOCHIMICE DE ACUMULARE A ACIDULUI CITRIC

O serie de ipoteze explică acumularea acidului citric prin inducerea unei stări anormale în metabolismul ciupercii (1) (2) (3). Prezentăm în figura 1 o schemă simplificată a sintezei acidului citric de către *A. niger*.

Referindu-ne la această schemă, conversia glucozei în acid piruvic are loc în *A. niger* prin sistemul de glicoliză anaerobă Embden-Meyerhof-Parnas (fig. 2), după cum au arătat foarte clar lucrările lui Meyrath (3). O intensificare a glicolizei poate duce la o acumulare de acid citric. Pe această cale se presupune că acţionează şi AMP ciclic, care, în concentraţii

de 10^{-6} M, determină o creștere a ratei de sinteză a acidului citric. Efecte asemănătoare au și adenozina, ATP și GMP ciclic, dar la concentrații mult mai mari (10^{-3}M). Wold și Suzuki (4) au corelat acțiunea AMP ciclic cu glicoliza, pornind de la faptele cunoscute că AMP ciclic este un regulator al glicolizei la mamifere, activează fosforilaza în *Neurospora*, deplasează echilibrul oxidare-reducere în favoarea oxidării în drojdii. În cazul particular al fungului *A. niger*, autorii menționați presupun că AMP ciclic are un metabolism anormal, astfel încît activează glicoliza, ceea ce în final duce la o sinteză în exces de acid citric. Aceiași autori propun însă și o altă explicație a efectului AMP ciclic și anume activarea procesului de secreție a acidului citric din celulă.

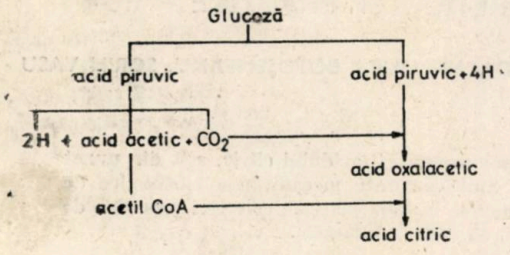


Fig. 1 — Schema simplificată a sintezei acidului citric de către *A.niger*.

Acidul piruvic rezultat din glicoliza anaerobă suferă pe de o parte o decarboxilare oxidativă, iar pe de altă parte o carboxilare reductivă, la care participă CO_2 și acetil-CoA rezultați din etapa de decarboxilare oxidativă (fig. 3).

Acidul oxalacetic produs în etapa anterioară intră în ciclul acizilor tricarboxilici (ATC), condensîndu-se chiar în prima fază cu acetil-CoA, cu formare de acid citric. Ulterior acest produs este metabolizat de-a lungul a numeroase faze intermediare, furnizînd energie metabolică (fig. 4). Gradul de participare a ciclului ATC la acumularea acidului citric este controversat. Shu, Funk și Neish (5) au arătat că circa 40% din acidul

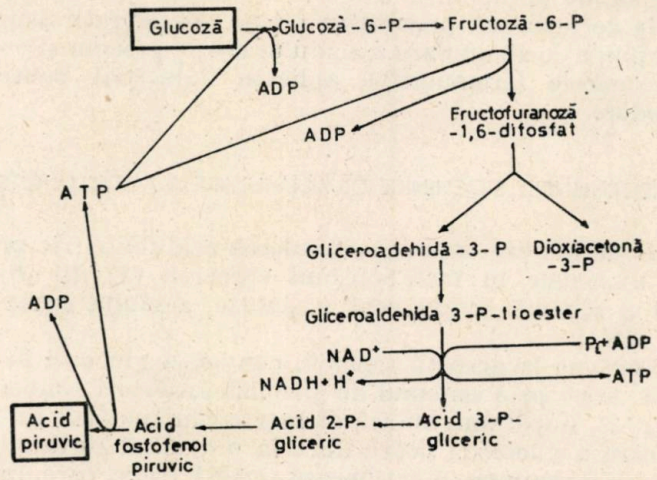


Fig. 2 — Ciclul Embden — Meyerhof — Parnas, de glicoliză anaerobă.

citric se formează prin reciclarea acidului oxalacetic. Alți autori, ca Bomstein și Johnson (6) sau Cleland și Johnson (7) nu au putut evidenția reciclarea decît într-o măsură foarte mică.

Rezultatele cercetării enzimelor și produșilor intermediari din ciclul ATC în timpul acumulării acidului citric sînt și ele oarecum divergente.

Ramakrishnan și colab. (8) au arătat că acumularea acidului citric are loc simultan cu dispariția din setul enzimelor ciclului ATC a aconitazei și izocitric dehidrogenazei, două enzime cheie implicate direct în metabolizarea acidului citric. LaNauze (9) a arătat însă că fungul *A. niger*

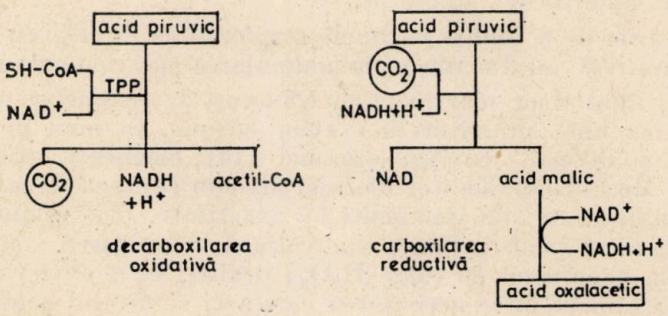


Fig. 3 — Metabolizarea acidului la acid oxalacetic.

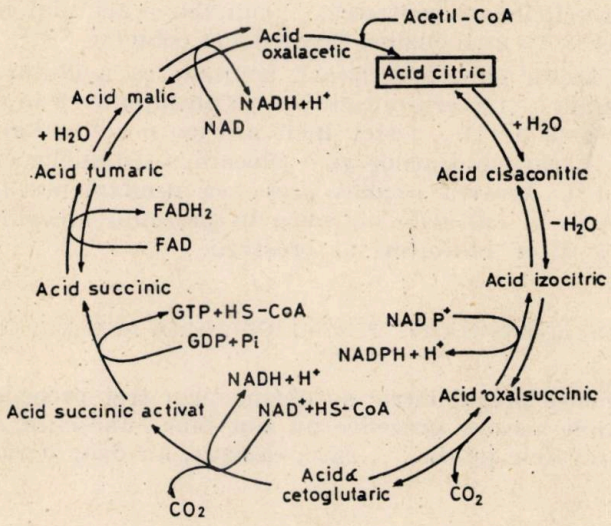


Fig. 4. — Ciclul acizilor tricarboxilici (ATC).

nu are loc nici un blocaj al ciclului ATC, toate enzimele acestui ciclu (inclusiv cele două menționate mai sus) fiind prezente în tot cursul acumulării acidului citric ; așadar procesul de acumulare nu pare să se datoreze absenței vreunei enzime din ciclul ATC. Această opinie a fost confirmată

și de Ahmed și colab. (10) care au arătat că toate enzimele responsabile de fazele de metabolizare a acidului citric în ciclul ATC (aconitaza, NAD- și NADP-izocitrat dehidrogenaza, succinat dehidrogenaza, fumaraza și malat dehidrogenaza) sînt prezente în celulele fungului în toată perioada fermentației, inclusiv a acumulării acidului citric. Deasemeni, Ahmed și Smith (11) au arătat că nivelul concentrației acizilor organici din ciclul ATC (piruvic, fumaric, succinic, α-cetoglutaric, cis-aconitic, malic și izocitric) nu variază apreciabil în cursul fermentației, deși cantitatea acidului citric intracelular crește foarte mult. Totuși datele de mai sus trebuiesc acceptate sub rezerva enunțată de autorii înșiși, și anume ele au fost obținute în condiții de laborator.

Încercările de a inhiba enzimele responsabile de utilizarea acidului citric în ciclul ATC au dus uneori la acumularea acestui compus.

Astfel, lipsa unor ioni metalici cofactori ai enzimelor menționate, sau adăugarea unor inhibitori ai acestor enzime, ca ionii de Cu^{+2} (12) H_2O_2(13) sau diverși compuși organici (14) blochează utilizarea acidului citric. Mecanismul acestor blocaje, precum și punctul (sau punctele) cheie ale inhibiției nu sînt cunoscute cu exactitate. Bruchmann (13) consideră că factorul principal care controlează acumularea acidului citric este inhibiția aconitazei de către H_2O_2; dealtfel el a observat o relație invers proporțională între activitatea catalazei și nivelul acidului citric. Deasemeni, el consideră că efectul stimulator al Cu^{+2} și Zn^{+2} se datorește inhibiției aconitazei de către Cu^{+2} și a unei enzime ulterioare aconitazei în ciclul ATC, de către Zn^{+2}. Pe de altă parte, Schweiger (12) consideră că factorul principal care controlează acumularea acidului citric este inhibiția de către Cu^{+2} a unei enzime ce are drept cofactor Fe^{+2}.

Un alt factor care favorizează acumularea acidului citric este și inhibiția generală a creșterii miceliului. Se presupune că în aceste condiții metabolismul este deviat, astfel încît are loc o acumulare a produșilor de degradare a carbohidraților și o blocare a sistemelor enzimatice din ciclul ATC (15). Aceasta explică creșterea randamentului de obținere a acidului citric în culturile obținute în prezența alcoolilor, hidrazidei maleice sau a altor inhibitori ai creșterii.

PROCEDEE FERMENTATIVE PENTRU OBȚINEREA ACIDULUI CITRIC

Actualmente acidul citric se obține prin trei procedee industriale diferite. Detaliile acestor procedee nu sînt bine cunoscute, singura informație fiind brevetele publicate, care, desigur, au doar o valoare orientativă.

Fermentația Koji

Substratul folosit în acest procedeu sînt rezidiile vegetale, ca resturile de cartofi dulci după extracția amidonului, sau tărîțele de grîu. Aceste materiale conțin cantități relativ mari de Fe^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, care pot inhiba producerea acidului citric, drept care fermentația Koji se realizează cu tulpini de *A. niger* selecționate, rezistente la acești ioni.

Desfășurarea fermentației cuprinde o primă etapă, în care amilaza din *A. niger* zaharifică amidonul, pentru ca în a doua etapă cea mai mare parte din zahărul produs să fie convertit în acid citric. Temperatura de incubare nu trebuie să depășească 28°C. După 5—8 zile de fermentație acidul citric acumulat corespunde unei acidități de pH 1,8—2,0. Acidul citric se extrage din materialul fermentat prin percolare și după aceea se prelucrează ca și în celelate procedee (16)(17).

O variantă a metodei, cu avantaje economice apreciabile, constă în suplimentarea rezidiilor vegetale cu depozitul rămas de la filtrarea acidului glutamic obținut tot pe cale fermentativă. Astfel, substratul vegetal se amestecă cu depozitul menționat în proporție de 3—7%, se sterilizează, se ajustează la pH 4—5 și la o umiditate de 70—80%. Se răcește la 60—80°C, se adaugă α-amilază. Cînd temperatura substratului a scăzut la 30—35°C, se inoculează sporii de *A. niger*, iar amestecul se pune — în grosime de 3—5 cm — în tăvi (16).

Fermentația în tăvi

Metoda clasică de obținere a acidului citric constă în folosirea unor căvi de aluminiu sau oțel inoxidabil, pentru a se evita coroziunea sau tontaminarea cu ioni metalici. Această metodă a fost descrisă cu suficiente detalii de către Prescott și Dunn (1) și de Mallea (18).

Inoculul este deobicei format din spori obținuți pe un mediu care favorizează sporularea. După nouă zile de creștere pelicula sporulată se dispersează mecanic în mediul de fermentație, care apoi se distribuie în tăvi. În tehnologiile mai recente, sporii se pulverizează cu un curent de aer pe mediile sterile din tăvi. Uneori un tratament adecvat al sporilor înaintea inoculării are efecte pozitive asupra procesului fermentativ. De și Srivastava au arătat că sporii de *A. niger* ultrasonați cu anumite doze prezentau randamente în acid citric direct proporționale cu dozele(19).

Substratul utilizat este deobicei melasa de sfeclă. Aceasta conține circa 80% substanță uscată și 20% apă. Substanța uscată constă din zaharoză 40%—60%, substanțe neazotate organice 16%, substanțe azotate 15%, cenușă 9% (15)(20). În afara melaselor, se mai folosesc zahărul purificat sau brut, siropul de trestie de zahăr sau din alte surse vegetale etc.

Melasele brute se diluează la circa 20% zahăr și se acidulează cu H_2SO_4 pînă la pH 2,4—4,0. Acidularea melaselor determină precipitarea unei anumite cantități de substanțe, în funcție de valoarea pH-ului : la pH 6,9 se separă 0,08 g, în timp ce la pH 3,0 se separă 3,5 g la 100 g melasă. Așadar în mediu acid precipită 25% din substanțele prezente în melasă : săruri de calciu și magneziu, unele sustanțe organice etc. Simultan are loc coprecipitarea microelementelor, vitaminelor și a altor biostimulatori (21). Se știe că prin precipitare în mediu acid cantitatea de biotină din melasă scade (22), iar coloizii adsorb așa numitul „factor producător"(23).

Pentru a evita aceste dezavantaje legate de acidularea melasei, au fost selecționate tulpini de *A. niger* bune producătoare de acid citric, care se dezvoltă la pH neutru (20)(21).

Melasele diluate se folosesc deseori ca atare, întrucît se consideră că ele conțin suficiente substanțe nutritive. În unele cazuri însă se adaugă

diverse surse de fosfor (acid fosforic) sau azot. Într-un studiu comparativ Srivastava și colab. au arătat că cele mai bune surse de azot pentru acumularea acidului citric sînt, în ordine : ureea, nitrobenzenul, azotatul de amoniu și azotatul de potasiu (24).

Un factor important în fermentație este compoziția în elemente minerale a melaselor. Unii cationi metalici inhibă puternic producerea de acid citric. Aceștia se îndepărtează prin tratarea melaselor cu ferosau fericianură de potasiu, care precipită în special fierul. În același scop s-au mai folosit adsorbenți (de ex. cărbunele animal) (25), sau schimbători de ioni. S-a arătat că deionizarea melaselor cu cationiți stabiliza randamentele în acid citric, altfel supuse variației în funcție de zona geografică de proveniență a melaselor (26).

Deionizarea melaselor nu trebuie însă să scadă concentrațiile unor microelemente sub limita care asigură o dezvoltare normală a fungului. Diferiți cationi au un rol important în fiziologia generală a *A. niger*, în tipul morfologic al miceliului respectiv, în stabilirea raportului între utilizarea zahărului din mediu în vederea creșterii și utilizarea lui în vederea conversiei în acid citric. Aceasta a determinat o serie de cercetări asupra acțiunii individuale sau sinergice a mai multor cationi asupra acumulării acidului citric în medii sintetice sau naturale.

Studii pe medii sintetice au arătat că producția de acid citric este favorizată de cantități mici de fier și zinc (2), de magneziu și potasiu, precum și de cantități foarte mici de fier și mangan (27), ca și de acetatul de plumb (28). Alți autori au arătat însă că manganul inhibă sinteza acidului citric (2). Divergențele se pot explica pe de o parte prin nivelele diferite de concentrație la care au fost testate elementele respective, iar pe de altă parte prin compoziția minerală globală a mediilor folosite. Astfel, într-un mediu cu compoziție minerală complexă s-au găsit următoarele concentrații optime ale componentelor : K_2HPO_4 — 0,1% ; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ — 0,02% ; fier, mangan, zinc- 1,0 mg/ml. În aceste condiții cuprul ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), cobaltul ($Co(NO_3)_2$) și molibdenul ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) în concentrații de ordinul μg/ml inhibau producția de acid citric (29). Rezultate diferite privind necesarul de cationi se pot obține și în funcție de tulpina sau mutantul de *A. niger* folosiți. Astfel s-a arătat că un mutant de *A. niger* producea cantități crescute de acid citric în prezența concomitentă a fierului și manganului, în concentrații de 1mg/100 ml, în timp ce zincul și cuprul nu aveau efecte semnificative (30).

Studii pe medii naturale au arătat că acumularea acidului citric în medii cu fructolină (un sirop natural) era favorizată de adăugarea a 10 ppm cupru (31). O abordare matematică (metoda Box-Wilson) a optimizării compoziției melasei în vederea producerii de acid citric de către un mutant de *A. niger* a dus la următoarea compoziție optimă în elemente : $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ — 971,0 ; $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ — 3,5 ; KH_2PO_4 —96,0 (mg/l) (32).

Randamentele de acid citric au fost crescute și prin adăugarea la mediile naturale a o serie de substanțe, mai mult sau mai puțin implicate în metabolismul general al fungului *A. niger*.

Aminoacizii adăugați la mediile de cultură aveau efecte diferite, în funcție de natura lor : acumularea acidului citric era de 38,2% în pre-

zenţa valinei şi de 52,4%, 53,2% şi 65,8% în prezenţa treoninei, alaninei şi respectiv lizinei (33).

Din seria alcoolilor inferiori, metanolul favorizează acumularea acidului citric atît în medii naturale cît şi sintetice, mai ales în cazul unor tulpini de *A. niger* slab producătoare (34). Metanolul 4% adăugat la melasele de trestie creşteau producţia de acid citric cu 50% (25).

Dintre inhibitorii enzimatici, hidrazida maleică adăugată la melasă a determinat o creştere de 2 ori a randamentului de acid citric faţă de zahărul consumat (35).

Desfăşurarea fermentaţiei are loc la 30°C. În primele 24 ore sporii germinează, după care deasupra tăvilor se suflă uşor aer umed, steril, timp de 5—6 zile. Insuflarea se continuă cu aer uscat iar la 8—10 zile de la inoculare fermentaţia se întrerupe. În acest moment cantitatea de zahăr din mediu reprezintă doar 1,3%, ca urmare a conversiei lui în acid citric.

În timpul fermentaţiei o atenţie specială se acordă pH-ului mediului de cultură, întrucît la pH-uri mai mari de 3,5 *A. niger* sintetizează cantităţi apreciabile de acid oxalic şi gluconic.

În general în procedeul fermentaţiei în tăvi circa 80—85% din zahărul din mediu este convertit, acidul citric reprezentînd circa 90% din aciditatea totală produsă prin fermentaţie.

Fermentaţia submersă

Acest procedeu, deja folosit de unele firme, tinde să înlocuiască procedeul fermentaţiei în tăvi. El a fost descris de Prescott şi Dunn (1), Lockwood şi Schweiger (36) şi Lockwood (37). Noyes a publicat în 1969 un referat general cuprinzînd informaţia brevetată în SUA asupra procedeului menţionat (38).

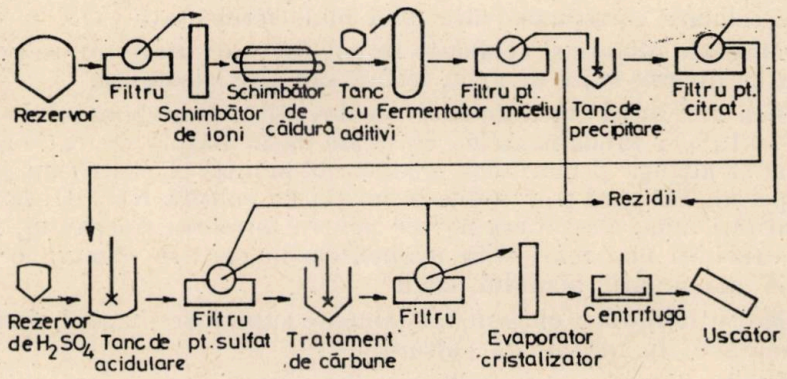


Fig. 5 — Diagrama producerii acidului citric prin procedeul fermentaţiei submerse (Reproducere din (37)).

Obţinerea acidului citric în culturi submerse a fost pusă la punct în urma cercetărilor lui Schweiger (12), Batti (39)(40) şi Batti şi Schweiger (41). Prezentăm în figura 5 o diagramă a procedeului de obţinere a acidului citric prin fermentaţie submersă.

Inoculul este reprezentat fie de spori, fie de celule preformate în culturi submerse adecvate, ceea ce micșorează timpul de folosire a fermentatorului. Tipul morfologic al agregatelor celulare folosite pentru inoculare este foarte important pentru procesul fermentativ ulterior. Acestea trebuie să fie sferice și dense, cu un diametru de 0,2—0,5 mm, cu hife laterale scurte și cu rezistență mecanică bună (42)(43).

Substratul este reprezentat de siropuri zaharoase, sirop de trestie în care 2/3 din zahăr este invertit, hidrolizate enzimatice de boabe de porumb, sorg sau amidon brut din cartofi dulci (44).

Recent s-a propus și utilizarea emulsiilor de hidrocarburi, dar se pare că acest substrat nu a fost încă introdus la scară industrială din diferite motive: datorită solubilității reduse, substratul nu poate fi folosit decît în concentrații mici. Pe de altă parte produsul final al fermentației conține, pe lîngă acidul citric și cantități apreciabile (pînă la 50%) de acid izocitric. Fermentația citrică cu hidrocarburi ca substrat este realizată de drojdii, deci este în afara obiectului acestui referat.

Siropurile vegetale se diluează la o concentrație de 15% zahăr și se deionizează; final pH-ul se corectează cu amoniac la valoarea de 2,0—4,0. Deionizarea este necesară deoarece acidul citric se acumulează în culturile submerse numai în medii deficitare în fier și magneziu (45)(46). Defavorabile acumulării acidului citric sînt și elementele nichel și cobalt, iar îndepărtarea lor cu ajutorul unui cationit îmbunătățește apreciabil randamentul în acest produs (47)(48). Snell și Schweiger au arătat că o bună producție de acid citric este condiționată de un raport bine stabilit între diferitele elemente minerale din melase: concentrația fierului nu trebuie să depășească 1 ppm; KH_2PO_4 (0,01 — 0,02%) este necesar în vederea limitării consumului de zahăr destinat creșterii în favoarea conversiei acestuia în acid citric; anumite concentrații minime de $MgSO_4$ (0,08—0,15%) și Zn^{+2} (0,002—0,004%) sînt indispensabile asigurării unei morfologii celulare corespunzătoare unei bune fermentații (47).

Melasele diluate și acidulate se pot folosi ca atare sau se pot suplimenta cu diverse surse de azot, fosfor, sau alte substanțe.

Cea mai bună sursă de azot s-a dovedit a fi carbonatul de amoniu (0,02—0,15%); randamentele creșteau dacă alături de carbonatul de amoniu se adăuga și morfolina —(dietanol amina) (47). Într-un procedeu mai special, Shepard a introdus în mediu de cultură NH_4OH, la început în cantități mici, atît cît era nevoie pentru formarea miceliului, iar apoi — în cantități mai mari — în momentele în care se observa o scădere a ratei acumulării acidului citric (49).

Moyer (50)(51) a obținut randamente superioare în acid citric adăugînd metanol în mediul de cultură.

Unele substanțe metabolizabile de natură lipidică favorizează procesul de acumulare a acidului citric (52)(53). Astfel, se explică și efectul pozitiv al detergenților de tip Tween (derivați sulfonați ai esterilor acizilor grași cu sorbitanul) adăugați inițial la lichidele de fermentație doar pentru a controla spumarea și a micșora riscul contaminării microbiene. Nu se poate spune cu certitudine însă dacă efectul detergenților se datorește într-adevăr unei metabolizări a acestora într-un intermediar al ciclului ATC, sau este vorba de un efect fizic (54).

Desfășurarea fermentației depinde de asigurarea unor condiții optime de aerobioză, drept care fermentatoarele se alimentează cu volume mari de aer sau aer-oxigen. Incubarea are loc la 30°, timp de 8—10 zile, perioadă după care circa 70—90% din zahăr este convertit în acid citric.

Un element foarte important este menținerea unui pH scăzut în toată perioada fermentației căci după cum am arătat la pH > 3,5 se sintetizează și acid gluconic și acid oxalic. Tveit a brevetat o metodă de suprimare aproape totală a sintezei de acid oxalic, prin intensificarea oxigenării și reducerea pH-ului într-un anumit moment al fermentației (42). În același scop Batti a controlat în toată perioada de fermentație concentrațiile metalelor alcaline și a fosfatului, astfel încît raportul acestora să nu depășească valoarea de 0,83, iar pH-ul a fost menținut sub valoarea 2 (40). Un pH scăzut al mediului de cultură mai are și avantajul evitării contaminării cu diverse microorganisme; totuși, chiar și în aceste condiții se pot dezvolta unele tulpini de *Penicillium*, care pot inhiba total producerea acidului citric. Schweiger a evitat contaminarea cu *Penicillium*, cu ajutorul Cu^{+2} adăugat în proporție de 5—200 ppm (55).

Fermentația se desfășoară în două etape. În prima etapă o parte din zahăr este utilizat pentru dezvoltarea miceliului, iar în a doua etapă creșterea este încetinită, cea mai mare parte din zahăr fiind convertită în acid citric. Procesul fermentativ este astfel controlat, încît să se reducă la minimum durata și consumul de zahăr în prima etapă și deasemeni să se încetinească cît mai mult creșterea în a doua etapă. În acest scop s-au pus la punct metode care modifică condițiile de cultivare în anumite momente ale fermentației.

Martin a obținut rate foarte mari de acumulare a acidului citric, eșalonînd fermentația în trei faze: în prima fază se pregătește un inocul standard de agregate celulare; în a doua fază inoculul se transferă în fermentator și se aerează pînă la un anumit grad de dezvoltare; în faza a treia aerul se înlocuiește cu oxigen, ceea ce inhibă creșterea și stimulează producția de acid citric (43).

Fried și Sandza au obținut randamente superioare în acid citric prin modificarea pH-ului în cursul fermentației: pH-ul inițial al mediului de cultură (4,0—6,0) s-a menținut constant pînă în momentul cînd s-a format o anumită cantitate de miceliu; după aceea acesta s-a scăzut la valoarea de 0,1—1,0 prin adăugare de acid (56).

Vergnaud și Niquet au dirijat fermentația prin controlul simultan al pH-ului și concentrației zahărului: în prima etapă miceliul se dezvoltă într-un mediu sărac în zahăr, la pH ~ 3; cantitatea mică de acid citric format în această etapă scade pH-ul sub valoarea 3. În a doua etapă se adaugă zahăr la pH < 3, formîndu-se masiv acid citric. În a treia etapă o parte din lichidul de fermentație se recoltează și se înlocuiește cu un volum egal de soluție de zahăr, care este integral convertit în acid citric (57).

La sfîrșitul fermentației mediul de cultură se filtrează, iar miceliul se spală pe o bandă rulantă sau într-o centrifugă tambur prevăzută cu un sistem pentru tocarea miceliului. Filtratul și apele de spălare reunite se precipită cu lapte de var pînă la neutralizarea acidului. După filtrare și spălare citratul de calciu se suspendă în tancul de acidulare, unde se adaugă acid sulfuric pînă la concentrația finală de 0,2%. Soluția diluată de acid citric se separă de sulfatul de calciu prin filtrare și se decolorează

cu cărbune. Filtratul se purifică apoi prin schimb ionic și se evaporă pînă la o concentrație de 35°—40° Baumé. Apele de cristalizare sînt eventual recirculate în tancul de precipitare. Concentratul de acid citric se încălzește la 36,6°C, cînd apar cristale anhidre, întimp ce sub această temperatură se formează monohidrați.

ÎNCHEIERE

Cele de mai sus relevă eficiența convertirii zahărului în acid citric pe cale fermentativă. Dealtfel și alți acizi organici, ca acidul gluconic, fumaric, itaconic sînt obținuți tot prin fermentație, cu ajutorul fungilor filamentoși. Faptul că în epoca noastră, o epocă — printre altele —și a industriei chimice de sinteză, acizii organici se obțin industrial prin procedee fermentative este relevant pentru marea capacitate a celulei fungice de a converti materiale ieftine în produși de sinteză valoroși.

În ceea ce privește producerea acidului citric, cele mai acute probleme de ordin practic sînt legate de reducerea duratei de fermentație; aceasta presupune controlul procesului fermentativ în așa fel încît raportul dintre perioada relativă de creștere și cea de acumulare a acidului organic să se deplaseze în favoarea acesteia din urmă.

O altă problemă este cea a stabilirii fracției spcifice a masei micelare responsabilă direct de sinteza acidului citric.

Rezolvarea problemelor enunțate presupune o abordare sistematică a mecanismelor biochimice de acumulare a acidului citric, care nu sînt încă elucidate.

Prezentat la redacție
la 30 noiembrie 1977

Institutul de Științe Biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296, cod 77748

PRODUCTION OF CITRIC ACID BY *ASPERGILLUS NIGER*. THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS

SUMMARY

A review is presented on the theoretical and practical aspects of citric acid production by *Aspergillus niger*. The biochemical mechanisms of citric acid accumulation are discussed, along with the three commercially known fermentation processes (Koji, shallow pans, submerged).

BIBLIOGRAFIE

1. S. C. Prescott, C. G. Dunn, *Industrial microbiology*, New York, London, Toronto, McGraw-Hill, 1959.
2. D. Perlmann, C. J. Sih, Progress Ind. Microbiol., **2**, 169 (1960).
3. J. Meyrath, Proc. Biochem., **2**, 25 (1967).
4. W. S. M. Wold, I. Suzuki, Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**, 237 (1973).
5. P. Shu, A. Funk, A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol., **32**, 68 (1954).
6. R. Bomstein, M. J. Johnson, J. Biol. Chem., **198**, 143 (1952).
7. W. W. Cleland, M. J. Johnson, J. Biol. Chem., **208**, 679 (1954).

8. C. V. Ramakrishnan, R. Steel, C. P. Lentz, Arch. Biochem. Biophys., **55**, 270 (1955).
9. J. M. Lanauze, J. Gen. Microbiol., **44**, 73 (1966).
10. S. A. Ahmed, J. E. Smith, J. G. Anderson, Trans. Brit. Mycol. Soc., **59**, 51 (1972).
11. S. A. Ahmed, J. E. Smith, în *Industrial aspects of biochemistry* vol. 30, editor B. SPENCER, North Holland, 1974, p. 309.
12. L. B. Schweiger, Patent SUA 2970084 (1961).
13. E. E. Bruchmann, Biochem. Zeitschrift **335**, 119 (1961).
14. J. B. Lockwood, M. A. Batti, Patent SUA 3189527 (1965).
15. G. J. Zhuravsky, Priklad. Biochim. Mikrobiol., **XII**, 349 (1976).
16. W. Hisanaga, S. Nakamura, Patent Japonia 16555/66 (1966).
17. K. Yamada, *Science in Japan* în *American Asociation for the Advancement of Science*, Washington D.C., 1965, p. 40.
18. Q. Mallea, Industria y Quimica **12**, 264 (1950).
19. S. K. De, A. S. Srivastava, Sci. Cult. **41**, 459 (1975).
20. T. I. Maslova, V. A. Smirnov, Priklad. Biochim. Mikrobiol., **XIII**, 545 (1977).
21. E. Y. Gorbataia, V. A. Smirnov, Priklad. Biochim. Mikrobiol., **IX**, 375 (1973).
22. N. I. Derkanosov, Teză de doctorat, Kiev, 1972.
23. J. Leopold, în *Materialele conferinței științifico-tehnice privind intensificarea proceselor de producere a acizilor din industria alimentară*, Riga, 1961.
24. A. S. Srivastava, S. P. Tandon, K. P. Tervari, Proc. Nat. Acad. Sci. India, Sect. A, 154 (1973).
25. H. S. Dhakhar, S. Ethiraj, S. E. Vyas, Indian J. Technol., **12**, 316 (1974).
26. P. Nandi, A. K. Mishra, *Fermentation Technology Today*, 4 th, **209**, 13 (1972).
27. A. Das, P. Nandi, Experientia **25**, 1211 (1969).
28. J. J. Fried, Patent RFG 2028933 (1971).
29. A. K. Banik, Folia Microbiol., **21**, 139 (1976).
30. A. Das, Bull. Bot. Soc. Bengal **26**, 67 (1972).
31. B. J. Macris, Biotechnol. Bioeng., **17**, 1373 (1975).
32. V. M. Golubtsova, Khlebopek. Konditer. Prom., **2**, 26 (1974).
33. A. S. Srivastava, S. P. Tandon, Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. A, **43**, 251 (1973).
34. J. Szczodrak, Z. Ilczuk, Przem. Ferment. Rolny, **19**, 20 (1975).
35. M. Ohtsuka, Patent Japonia 7530158 (1975).
36. L. B. Lockwood, L. B. Schweiger, *Critic and itaconic acid fermentations*, în Microbiol. Technol editor N. J. PEPPLER, Reinhold Publ. Comp. 1967, p. 183.
37. L. B. Lockwood, *Organic acid production by mycelial fungi*, în *The filamentous fungi*, vol. 1, Industrial mycology, editori J. B. SMITH, D. E. PERRY, Edward Arnold Ltd., London, 1974, p. 140.
38. R. Noyes, Chem. Proc. Rev., 37 (1969).
39. M. A. Batti, Patent SUA 3290227 (1966).
40. M. A. Batti, Patent SUA 33355067 (1967).
41. M. A. Batti, L. B. Schweiger, Patent SUA 3078217 (1963).
42. M. T. Tveit, Patent SUA 2883329 (1963).
43. S. M. Martin, Patent SUA 2739923 (1956).
44. E. J. Swarthout, Patent SUA 3285831 (1966).
45. P. Shu, M. J. Johnson, J. Bacteriol. **54**, 161 (1947).
46. P. Shu, M. J. Johnson, J. Bacteriol. **56**, 577 (1948).
47. R. L. Snell, L. B. Schweiger, Patent USA 2492667 (1949).
48. J. C. Woodward, R. L. Snell, R. S. Nicholls, Patent SUA 2492673 (1949).
49. M. W. Shepard, Patent SUA 3083144 (1963).
50. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., **1**, 1 (1953).
51. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., **1**, 8 (1953).
52. N. F. Millis, B. Trumph, B. N. Palmer, J. Gen. Microbiol., **30**, 365 (1963).
53. W. Gold, R. J. Kieber, Patent SUA 3372094 (1968).
54. J. E. Smith, A. Nowakowska-Waszczuk, J. G. Anderson, *Organic acid production by mycelial fungi* în *Industrial Aspects of Biochemistry* editor B. SPENCER, North Holand 1974, p. 297.
55. L. B. Schweiger, Patent SUA 2916420 (1959).
56. J. H. Fried, J. G. Sandza, Patent SUA 2910409 (1959).
57. P. Vergnaud, R. Niquet, Patent SUA 2883329 (1959).

8. C. V. Ramakrishnan, R. Steel, C. P. Lentz, Arch. Biochem. Biophys., 55, 270 (1955).
9. J. M. Lanauze, J. Gen. Microbiol., 44, 73 (1966).
10. S. A. Ahmed, J. E. Smith, J. G. Anderson, Trans. Brit. Mycol. Soc., 59, 51 (1972).
11. S. A. Ahmed, J. E. Smith, in *Industrial aspects of biochemistry* vol. 30, editor B. SPENCER, North Holland, 1974, p. 309.
12. L. B. Schweiger, Patent SUA 2970084 (1961).
13. E. E. Bruchmann, Biochem. Zeitschrift 335, 119 (1961).
14. J. B. Lockwood, M. A. Batti, Patent SUA 3189527 (1965).
15. G. J. Zhuravsky, Priklad. Biochim. Mikrobiol., XII, 349 (1976).
16. W. Hisanaga, S. Nakamura, Patent Japonia 16555/66 (1966).
17. K. Yamada, *Science in Japan in American Association for the Advancement of Science*, Washington, D.C., 1965, p. 40.
18. Q. Mallea, Industria y Quimica 12, 264 (1950).
19. S. K. De, A. S. Srivastava, Sci. Cult. 41, 459 (1975).
20. T. I. Maslova, V. A. Smirnov, Priklad. Biochim. Mikrobiol., XIII, 545 (1977).
21. E. Y. Gorbataia, V. A. Smirnov, Priklad. Biochim. Mikrobiol., IX, 375 (1973).
22. N. I. Derkanosov, Teză de doctorat, Kiev, 1972.
23. J. Leopold, in *Materialele conferinței științifico-tehnice privind intensificarea proceselor de producere a acizilor din industria alimentară*, Riga, 1961.
24. A. S. Srivastava, S. P. Tandon, K. P. Tervari, Proc. Nat. Acad. Sci. India, Sect. A. 154 (1973).
25. H. S. Dhakhar, S. Ethiraj, S. E. Vyas, Indian J. Technol., 12, 316 (1974).
26. P. Nandi, A. K. Mishra, *Fermentation Technology Today*, 4 th, 209, 13 (1972).
27. A. Das, P. Nandi, Experientia 25, 1211 (1969).
28. J. J. Fried, Patent RFG 2028933 (1971).
29. A. K. Banik, Folia Microbiol., 21, 139 (1976).
30. A. Das, Bull. Bot. Soc. Bengal 26, 67 (1972).
31. B. J. Macris, Biotechnol. Bioeng., 17, 1373 (1975).
32. V. M. Golubtsova, Khlebopek. Konditer. Prom., 2, 26 (1974).
33. A. S. Srivastava, S. P. Tandon, Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. A. 43, 251 (1973).
34. J. Szczodrak, Z. Ilczuk, Przem. Ferment. Rolny, 19, 20 (1975).
35. M. Ohtsuka, Patent Japonia 7530158 (1975).
36. L. B. Lockwood, L. B. Schweiger, *Critic and itaconic acid fermentations*, in Microbiol. Technol editor N. J. PEPPLER, Reinhold Publ. Comp. 1967, p. 183.
37. L. B. Lockwood, *Organic acid production by mycelial fungi*, in *The filamentous fungi*, vol. 1 Industrial mycology, editori J. B. SMITH, D. E. PERRY, Edward Arnold Ltd. London, 1974, p. 140.
38. R. Noyes, Chem. Proc. Rev., 37 (1969).
39. M. A. Batti, Patent SUA 3290227 (1966).
40. M. A. Batti, Patent SUA 33355067 (1967).
41. M. A. Batti, L. B. Schweiger, Patent SUA 3078217 (1963).
42. M. T. Tveit, Patent SUA 2883329 (1963).
43. S. M. Martin, Patent SUA 2739923 (1956).
44. L. J. Swarthout, Patent SUA 3285831 (1966).
45. P. Shu, M. J. Johnson, J. Bacteriol. 54, 161 (1947).
46. P. Shu, M. J. Johnson, J. Bacteriol. 56, 577 (1948).
47. R. L. Snell, L. B. Schweiger, Patent USA 2492667 (1949).
48. J. C. Woodward, R. L. Snell, R. S. Nicholls, Patent SUA 2492673 (1949).
49. M. W. Shepard, Patent SUA 3083144 (1963).
50. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., 1, 1 (1953).
51. A. J. Moyer, Appl. Microbiol., 1, 8 (1953).
52. N. F. Millis, B. Trumph, B. N. Palmer, J. Gen. Microbiol., 30, 365 (1963).
53. W. Gold, R. J. Kieber, Patent SUA 3372094 (1968).
54. J. E. Smith, A. Nowakowska-Waszczuk, J. G. Anderson, *Organic acid production by mycelial fungi* in *Industrial Aspects of Biochemistry* editor B. SPENCER, North Holland 1974, p. 297.
55. L. B. Schweiger, Patent SUA 2916420 (1959).
56. J. H. Fried, J. G. Sandza, Patent SUA 2910409 (1959).
57. P. Vergnaud, B. Niquet, Patent SUA 2883329 (1959).

AL XI-LEA CONGRES INTERNAȚIONAL DE BIOCHIMIE

Al XI-lea Congres Internațional de Biochimie va avea loc la Toronto, Canada, între 8 și 14 iulie 1979. El va fi organizat de Societatea Canadiană de Biochimie, sub egida Uniunii Internaționale de Biochimie.

Programul științific va reflecta stadiul actual al cercetării în domeniile cele mai dinamice ale biochimiei, în 1979. În sesiunile simpozioanelor vor fi prezentate conferințe de către invitații organizatorilor. Lucrările vor fi depuse sub formă de poster.

Atît sesiunile de poster, cît și simpozioanele vor fi consacrate următoarelor probleme :

1. Structura, organizarea și replicarea elementelor genetice.
2. Expresia genetică și reglarea ei.
3. Structura și funcția proteinelor.
4. Mecanismul și reglarea acțiunii enzimelor.
5. Structura și funcția membranelor.
6. Bioenergetică și transport.
7. Biochimia creșterii și diferențierii.
8. Aspecte biochimice ale imunologiei.
9. Neurochimie.
10. Biochimia sistemelor senzorial, contractil și motil.
11. Hormonii ; biochimie și mecanisme moleculare de acțiune.
12. Mecanismele moleculare ale bolilor.
13. Biochimia mediului înconjurător.

Alte detalii sînt prezentate în prima circulară ce poate fi obținută de la :

R. W. Dolan
Secretar executiv
XI Congres Internațional de Biochimie
c/o National Research Council of Canada
Ottawa, Ontario, CANADA K. 1A OR6.

RECENZII

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Asbestos (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenezei chimice la om. Asbestul) Volume 14. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977. 106 p.

Asbestul a mai făcut obiectul unei monografii IARC (nr. 8, 1973); în volumul de faţă — care reprezintă punctul de vedere al grupului de lucru IARC, Lyon, 14/17 decembrie 1976 — se discută pe larg datele fizico-chimice, producţia, folosirea şi detectarea acestui material şi se dezvoltă informaţiile privind relaţia organism — asbest.

Printre acestea se înscriu carcinogeneza experimentală, studiile epidemiologice, bolile profesionale (industriile de prelucrare şi utilizare a asbestului), relaţia cancerului pulmonar, provocat de asbest cu fumatul etc.

De asemenea, sînt discutate şi aspecte particulare, ca riscul de îmbolnăvire prin expunere la minerale care conţin asbest.

Sînt consemnate caracteristicile generale şi particulare ale fibrelor de asbest în plămîn precum şi implicaţiile asbestozei.

Volumul se încheie printr-un tabel rezumativ şi prin considerarea unor probleme diverse legate de expunerea la asbest.

Vl. Gheordunescu

Pathology of tumors in laboratory animals Volume I — „Tumors of the Rat", Part. 2. (Patologia tumorilor la animalele de laborator, vol. I, Tumorile la şobolan, Partea a 2-a) Editor în chief V. S. Turusov. IARC Scientific Publications No. 6, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976, 315 p.

Partea a 2-a a volumului consacrat tumorilor la şobolan, cuprinde 315 pagini de text şi 478 fotografii de probe macroscopice, histologice şi electrono-optice. Fotografiile sînt judicios alese şi de bună calitate.

În cele 13 capitole sînt descrise tumorile care apar la tractusul respirator, ficat, rinichi, pelvisul renal şi uretere, vezica urinară, testicul, glandele anexe ale aparatului genital mascul, vagin, uter, placentă şi oviduct, ovar, glanda hipofiză, glanda tiroidă, glandele suprarenale, sistemul nervos central şi periferic, inimă.

Fiecare capitol cuprinde o notă introductivă şi cîteva subcapitole în care se descriu structura normală a organului sau sistemului studiat, morfologia şi biologia tumorilor, tipurile histologice de tumori, tumorile apărute spontan, inducţia tumorilor precum şi aspecte comparative.

Remarcăm utilitatea acestei serii de monografii privind patologia tumorilor la animalele de laborator întrucît tumorile spontane sau induse la aceste animale se dovedesc excelente modele pentru cunoaşterea şi tratamentul tumorilor umane. Ar fi de dorit ca autorii să introducă organizat, în volumele următoare, informaţii privind transplantabilitatea tumorilor.

C. C. Prunescu

Proceedings in Life Science", „*Plant Growth Regulation*, Editat de P. E. Pilet, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1977, 305 p., 128 fig.

Volumul de faţă conţine lucrările celei de a 9-a Conferinţe Internaţionale asupra Substanţelor de Creştere a Plantelor, care a avut loc în 30 August — 4 Septembrie 1976, la Lausanne. Conferinţa s-a bucurat de participarea a peste 420 oameni de ştiinţă din 42 ţări.

Lucrările Conferinţei desfăşurîndu-se pe secţiuni, acestea se regăsesc şi în structura volumului sub forma respectivelor capitole. „Pereţii celulelor în creştere", primul capitol, abordează chestiuni legate de structura moleculară a pereţilor celulari primari şi alungirea lor. Se corelează tot odată, procesele de creştere cu metabolismul celulozei şi se caută legătura

dintre extensibilitatea pereților celulari și efectele auxinei. „Hormoni-membrane", un alt capitol, caută să stabilească situsul de acțiune al hormonilor vegetali implicați în procesele de creștere. „Analizele de hormoni", este un capitol dedicat celor mai recente metode pentru analiza hormonilor din plante, cum ar fi cromatografia în gaze și lichide etc.

„Auxinele și inhibitorii creșterii rădăcinii" constituie un capitol în care sînt prezentate mecanismele biochimice și mediatorii chimici, implicați în realizarea efectului fiziologic, atît de important pentru rădăcini, numit geotropism negativ. „Giberelinele și citochininele" încearcă să lămurească unele probleme legate de controlul umoral al creșterii. Ca și în capitolele precedente, se insistă asupra unor aspecte biochimice și fiziologice cum ar fi transportul acestor hormoni în plante și legătura lor cu metabolismul celular. „Etilena și alți regulatori", „Controlul hormonal", și „Demonstrațiile lucrărilor" sînt următoarele capitole. Problemele abordate, nu mai puțin interesante, sînt tratate în aceeași manieră precisă și cu o evidentă preocupare pentru conciziune. Lucrarea are de asemeni un index de subiecte și este, nu numai interesantă în sine, dar și accesibilă, avînd o prezentare grafică deosebită.

Mihai Zamfir-Grigorescu

IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic risk of chemicals to man. Some Miscellaneous Pharmaceutical Substances (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenezei chimice la om. Unele substanțe farmaceutice) Volume 13. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977. 255 p.

Volumul de față reprezintă punctul de vedere al grupului de specialiști IARC, întruniți la Lyon, la 18/25 octombrie 1976.

După expunerea scopului și metodologiei de întocmirea monografiilor, a evaluării datelor și a celorlalte considerente care stau la baza activității grupului IARC, urmează un subcapitol care înglobează caracteristici generale asupra substanțelor considerate în volum; sînt menționate, de asemenea, motivele pentru care unele medicamente nu au fost incluse în acest volum. Se fac considerații chimice asupra transformărilor în organism a unor medicamente în substanțe cu grupări susceptibile de a fi cancerigene; se atrage atenția asupra relațiilor dintre cancer și alte boli, precum și asupra altor aspecte.

Un număr de 17 medicamente, cu întrebuințări diverse, sînt indexate și analizate ca proprietăți fizico-chimice, analitice, uz, cancerogeneză la animale, etc. Printre acestea sînt substanțe cu acțiune antiseptică (acriflavina), antireumatică (aurotioglucoza), antimalarică (clorochina), sedativă (diazepam și oxazepam), contra paraziților (metranidazol, hidroxichinolină), etc.

Vl. Gheordunescu

Monographs on Theoretical and Applied Genetics. 3., D. de Nettancourt, INCOMPATIBILITY IN ANGIOSPERMS (Incompatabilitatea la Angiosperme) ed. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, 230 p. 45 fig.

Acest volum ia în discuție și ordonează numărul mare de date izolate, obținute de genetică. citologie, biochimie, sistematică și fiziologie în studierea incompatibilității proprii și a incompatibilității interspecifice la Angiosperme.

Primele patru capitole, destinate incompatibilității proprii, tratează evoluția probabilă și ultrastructura incompatibilității, baza ei genetică precum și diferitele mecanisme de incompatibilitate care acționează în natură.

Capitolul cinci se ocupă de incompatibilitatea interspecifică, iar capitolul șase și ultimul, examinează critic importanța incompatibilității pentru cercetarea în biologia fundamentală și în domeniul creșterii plantelor.

Se elaborează numeroase modele și ipoteze care explică aspectele mai puțin cunoscute ale sistemelor de incompatibilitate. Se acordă de asemenea importanță tehnicilor se folosesc mutanți și culturi, autorul prezentînd un adevărat arsenal de metode. Prezentarea acestor metode, ilustrația grafică precum și bogata bibliografie a acestui volum, ajută cititorului-genetician, citolog sau biolog — în cunoașterea eficientă a acestui domeniu.

Maria Andraș

Cell differentiation in microorganisms, Plants and animals (Diferențierea celulară la microorganisme, plante și animale) ed. L. Nover și K. Mothers, VEB Gustav Fischer, Verlag Jena, 1977, 640 p., 193 fig.

Volumul de față cuprinde lucrările Simpozionului internațional organizat în perioada 11—16 aprilie 1976, în Thuringia, R.D.G., care a întrunit peste 100 de specialiști din 12 țări.

Prima parte a volumului, destinată reglării celulare, este împărțită în cinci capitole care tratează despre : mecanismul transcripției și translației, ARN pre-mesager precum și probleme ale degradării proteinelor.

Partea a doua tratează aspectele tipice ale diferențierii celulare, ca : ciclul celular, enzimele implicate în diferențiere, biogeneza și transformarea organitelor celulare.

Bibliografia aferentă fiecărui capitol precum și rezumatul contribuțiilor aduse de participanții la discuții, ușurează consultarea volumului. De asemenea, prin competența participanților și problematica abordată, acest simpozion devine punct de referință pentru toți cei interesați în domeniul diferențierii celulare.

Maria Andraș,

Radiation chemistry, Editat de P. Hedvig și R. Schiller, Editura Academiei Budapesta, 1977, 1085 p.

Chimia radiațiilor constituie deja un domeniu format și bine delimitat în care s-au făcut importante progrese metodologice și de cercetare. Acest fapt se explică, printre altele, și prin aceea că el înglobează o parte însemnată a fenomenului radioactivității care se bucură în ultimii ani de o dezvoltare deosebită. Ca urmare a marii dezvoltări a acestei ramuri a chimiei s-a ajuns la o acumulare de fapte experimentale și date care au făcut deosebit de necesare unele tentative de ordonare a lor. Dintre aceste manifestări fac parte și simpozioanele Tihany (R. P. Ungaria) ajunse în 1976 la a 4-a ediție și bucurîndu-se în continuare de un deosebit succes exprimat într-o abundentă participare externă (173 de participanți din 22 de țări) și un ridicat număr de lucrări prezentate (141). Aceste lucrări precum și discuțiile ocazionate de susținerea lor constituie conținutul volumului de față.

El este structurat, ca și simpozionul, după o schemă care cuprinde 4 părți. Prima parte, intitulată „Materiale organice", privește radioliza compușilor organici micromoleculari de cele mai diferite tipuri : alcani, cicloalcani, alchene, diene, complexi, compuși arilici halogenați, mercaptoi și tioaciz', alcooli, tioli, sulfuri, silicați de alchil, peptizi etc. Sînt prezentate de asemeni fenomene dintre care unele, ca și anumite tehnici de altfel, deosebit de importante pentru acești compuși, cum ar fi : neutralizarea ionilor în radioliza în fază gazoasă, efectul structurii moleculare asupra radiolizei, efectele structurale ale radiolizei, dependența de căldură a mobilității electronilor etc.

A-2-a parte intitulată „Polimeri", tratează transformările suferite de diverși polimeri sub influența diverselor tipuri de radiații. Sînt prezentate unele fenomene de mare interes practic ca : polimerizarea monomerilor vinilici indusă prin iradiere, efectele inhibitorilor asupra polimerizării induse în fază solidă prin iradiere, modelarea polimerizării în stare solidă etc. Se prezintă de asemeni și anumite procedee de analiză și dirijare a proceselor de radioliză.

A-3-a parte consacrată soluțiilor apoase și chiar intitulată „Soluții apoase", grupează acele fenomene care beneficiază de facilitatea desfășurării în mediu apos, apa însăși fiind obiectul citorva comunicări de un deosebit interes și cu ample semnificații biochimice. Numeroși compuși de importanță biochimică se găsesc printre subiectele lucrărilor din această secțiune a simpozionului.

Părții a 4-a care are o structură de mozaic, sugestiv intitulată „Lucrări amestecate", îi revin numeroase probleme foarte atractive cum ar fi : influența radiațiilor electromagnetice de mare energie asupra moleculelor, stabilitatea față de radiații a anumitor cristale lichide, etc. Ținuta științifică și grafica aleasă a acestui volum sînt numai unele dintre calitățile care îl recomandă atenției noastre.

Mihai Zamfir-Grigorescu

V. YA. ALEXANDROV, *Ecological studies 21, Cells, molecules and temperature*; *Conformational flexibility of macromolecules and ecological adaptation* (Celule, molecule și temperatură; flexibilitatea conformațională a macromoleculelor și adaptarea ecologică), Soringer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 330 p., 74 fig.

Cartea publicată de editura Springer este traducerea în limba engleză a originalului în limba rusă. „Kletki, makromolekuly i temperatura", scris de unul din reprezentanții cei mai de seamă ai citofizioecologiei contemporane, prof. V. Ya. Alexandrov.

Ideea de bază a monografiei este corelația dintre nivelul de flexibilitate conformațională a moleculelor proteice și termoecologia unei specii, ceea ce are ca rezultat menținerea moleculelor proteice într-o stare semilabilă. Autorul arată că acest principiu al semistabilității este aplicabil deasemeni și acizilor nucleici și acizilor grași.

În mod special trebuie subliniat faptul că autorul își argumentează ipoteza enunțată mai sus cu exemple de termoecologie din domeniul plantelor, animalelor, microorganismelor, relevînd caracterul general valabil al acesteia.

Lucrarea are deasemeni meritul de a sumariza peste 500 de lucrări ale autorilor sovietici, făcîndu-le astfel cunoscute — într-un mod concis, sistematic — și specialiștilor necunoscători ai limbii ruse.

Volumul prezintă un interes special nu numai pentru biologii preocupați de adaptările modificaționale și genotipice la nivel celular și molecular, dar și pentru cei ce lucrează în aclimatizarea organismelor la medii cu temperaturi diferite. Pentru tinerii cercetători cartea este o valoroasă sursă de informație privind metodologia cercetării adaptării și rezistenței organismelor.

Constanța Mușolan

Cell genetics in higher plants (Genetică celulară în plantele superioare); editori D. Dudits G. L. Farkas, P. Maliga, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1976, 251 p.

În 1976 (5 — 17 iulie) a avut loc la Szeged, Ungaria, un curs internațional, urmat de 25 de tineri specialiști din 16 țări, pe teme de genetică la plantele superioare. Cursul, organizat de Centrul de Cercetări Biologice Szeged al Academiei Ungare de Științe, sub auspiciile UNESCO, UNDP (Programul Națiunilor Unite pentru Dezvoltare), ICRO (Organizația Internațională pentru Cercetarea Celulei), a fost ținută de un corp profesoral internațional. El a fost conceput pe de o parte ca un simpozion, la care s-au prezentat 17 comunicări, iar pe de altă parte, ca o sesiune de 6 lucrări practice.

Volumul de față cuprinde atît textele conferințelor prezentate în cadrul simpozionului, cît și protocoalele experimentale ale sesiunii de lucrări practice.

În cadrul simpozionului au fost prezentate conferințe asupra celor mai importante probleme actuale ale geneticii plantelor superioare. Una din conferințe (H. E. Street) a prezentat culturile de celule vegetale drept un instrument în genetica plantelor. O serie de conferințe au avut ca obiect mutanții obținuți pe cale biochimică (G. P. Rédéi, G. Acedo), sau în culturi de celule (P. Maliga). O altă serie de conferințe au discutat problema integrării ADN exogen în plante (P. F. Lurquin), folosirea plasmidelor bacteriene în acest scop (F. Cannon). S-a pus deasemeni problema izolării (O. L. Garuborg) și cultivării (I. Potrykus, T. Ch. Harms, H. Lörz), protoplastelor. Fuziunea protoplastelor (D. Dudits) și obținerea hibrizilor somatici la plantele superioare (E. C. Cocking, H. H. Smith) și la fungi (L. Ferenczy) au fost deasemeni dezbătute în cadrul simpozionului. Alte trei conferințe s-au ocupat de posibilitatea transferului de organite subcelulare în protoplaste (I. Potrykus, H. Lörz) sau subprotoplaste (H. Binding, R. Kollman) precum și de utilizarea protoplastelor în studiul virușilor plantelor.

Sesiunea de lucrări practice s-a axat pe obținerea culturilor de polen (C. Nitsch), a culturilor de protoplaste (H. Binding, J. I. Nagy), fuzionarea protoplastelor (K. N. Kao), captarea nucleilor (H. Lörz, I. Potrykus), și a plasmidelor bacteriene (F. Cannon, P. Lurquin) de către protoplastele vegetale.

Conținutul volumului este elocvent pentru calitatea cursului, care interesează nu numai pe cei ce lucrează în genetica plantelor sau biologie celulară, ci un cerc mult mai larg de specialiști.

Constanța Mușolan

Proceedings in Life Sciences, Plant tissue culture and its bio-technological application (Culturi de țesuturi vegetale și aplicațiile lor biotehnologice), editori W. Barz, E. REINHARD, M. H. ZENK, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, 419 p., 196 figs.

Culturile celulare ale plantelor superioare constituie domeniul de cercetare cel mai dinamic și de perspectivă în biologia experimentală. Cartea de față vine să confirme aceasta, prezentînd într-un tot unitar, o culgere de articole expuse cu prilejul Congresului Internațional al Cercetării Plantelor Medicinale de la Munich — 1976. Ea realizează o privire de ansamblu asupra rezultatelor obținute în ultimii ani în acest domeniu, subliniind perspectivele largi de aplicabilitate în biologie, medicină, farmacie, agricultură-silvicultură și în industrie.

Lucrarea se adresează biologilor, biochimiștilor și tuturor celor interesați în studiul culturilor celulare, oferind un material informațional complex și la zi, atît asupra unor probleme teoretice de mare actualitate, cît și asupra unor aspecte biotehnologice de însemnătate deosebită.

Astfel, cele 35 lucrări grupate în 7 capitole, abordează în primul rînd probleme legate de perspectivele oferite de culturile celulare ale plantelor superioare pentru obținerea pe scară industrială a diferiților produși secundari cu activitate biologică, farmacologică și terapeutică.

De un deosebit interes, sînt lucrările privitoare la posibilitățile de obținere a protoplaștilor și de utilizare a acestora în cercetări de hibridizare somatică și obținere de haploizi de interes economic.

Un capitol tratează probleme legate de procesele de diferențiere și de regenerare a plantelor pornind de la celule sau țesuturi izolate și de posibilitățile de aplicare a tehnicilor de culturi celulare în ameliorarea plantelor. Sînt prezentate aspecte ale proceselor de biotransformare și catabolism. Sînt descrise tehnologii noi, legate de aplicabilitatea culturilor celulare în scopuri biotehnologice.

Prin multitudinea de aspecte abordate și noutatea multora dintre problemele prezentate, cartea de față reprezintă o sursă de informare metodologică deosebit de utilă, accentuînd în același timp multiplele posibilități de aplicare a culturilor celulare vegetale, în scopuri biotehnologice.

Aurelia Brezeanu

E. B. EDNEY, *Zoophysiology, and Ecology*. 9, *Water balance in land arthropods*, (Bilanțul apei la Artropodele terestre), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 1977, 282, 109 fig.

Cartea cuprinde o trecere în revistă a tuturor datelor acumulate în ultimele decenii referitoare la bilanțul apei la nevertebratele terestre, în special la insecte. Sînt expuse pe larg, căile de dobîndire și pierdere a apei, factorii interni și externi care determină rata și amploarea circulației apei la aceste organisme. În paralel, însă strict circumscrise subiectului sînt tratate și o serie de probleme, referitoare la modalitățile de reglare a bilanțului apei, cele cu valoare adaptativă, apărute în cursul evoluției cît și la procesele de scurtă durată, de reglare momentană, pe cale fiziologică.

La fiecare capitol, acolo unde este cazul, se face un rapel anatomic, cu prezentarea succintă a ultimelor informații dobîndite, în legătură cu structura fină, cu ajutorul microscopului electronic, modelării matematice sau analizei biochimice. În acest sens sînt interesante de semnalat capitolele referitoare la pierderile de apă pe cale cuticulară, respiratoare și excretoare.

Capitolul privitor la excreția apei, este foarte dens, conținînd o impresionantă cantitate de informații referitoare la principalele clase de artropode.

Sînt analizate pe scurt și datele privitoare la bilanțul apei la unele stadii preimaginale, în special la ouăle insectelor.

Lucrarea destinată unui cerc mai larg de specialiști interesați în studiul multilateral al artropodelor, inclusiv ecologilor de teren, este de fapt un capitol special al unui excelent tratat de fiziologie a artropodelor, utilizabil ca o prețioasă sursă de referințe aduse la zi, mai ales de către cei interesați în fiziologia comparativă.

Este de semnalat faptul că autorul pe parcursul expunerii, indică direcțiile în care adîncirea, și diversificarea cercetării, poate aduce noi date necesare elucidării unor procese ce au

rămas încă obscure. Una din aceste direcții ar fi integrarea componentelor bilanțului hidric, cu referire la animalul întreg, aflat în mediul său natural de viață, cercetare la care contribuția ecologilor ar putea fi deosebit de importantă. Datorită bogăției de date noi, expunerii curgătoare și foarte succinte „la obiect" lucrarea lui E. B. Edney reprezintă o contribuție valoroasă, utilă în cercetare și în învățământul superior.

Eleonora Dincă

K. — E. SCHENK, B. KLUMPER, N. LEISE, D. WURSTER, *Industrielle Ost-West-Kooperation.* Ökonomische Studien. Band 25, Aus dem Institut für Aussenhandel und Überseewirtschaft der Universität Hamburg. (Cooperare industrială Est-Vest). Studii economice, vol. 25, din Institutul de Comerț Exterior și Economie trans-atlantică al Universității din Hamburg, editura Gustav Fischer, Stuttgart, New York, 1977, 3 fig., 85 tabele, 287 pag.

În prezentul studiu autorii supun unei analize multilaterale și profunde cooperarea industrială, forma de relație relativ recent instituită și cuprinsă într-o continuă dezvoltare dintre întreprinderile din țările apusene și cele din răsăritul Europei.

După o analiză a motivelor de înființare a cooperării Est-Vest, în cadrul capitolului I, autorii trec în cel de al doilea capitol la expunerea formelor ei de organizare și a modului ei de funcționare.

Cap. III, tratează despre credit și cooperare drept corective pentru evoluții greșite în comerțul și în producția țărilor CAER.

Cap. IV, se referă la politica de stat în problema cooperării cu referire specială la politica în domeniul de comerț al țărilor Pieții Comune.

Cap. V, și ultimul, analizează rezultatele obținute în această formă a relațiilor de comerț Est-Vest și explică o serie de probleme teoretice deosebit de importante.

Horst D. Schell

H. — J. HAASE, *Therapie mit Psychopharmaka und anderen seelisches Befinden beeinflussenden Medikamenten* (Terapia cu substanțe psihofarmacologic active și cu alte medicamente care influențează starea psihică) ediția a IV-a, lărgită și revizuită, editura F. K. Schattauer, Stuttgart, New York, 1977, 61 fig., 39 tabele, 527 pag.

Cartea scrisă într-un mod deosebit de sistematizat, cu sublinieri în text și la marginea paginilor, cu grafice și tabele, se bazează pe o bogată experiență clinică a autorului și a altor coautori și tratează o problemă de cea mai mare actualitate. Materialul este grupat pe 10 capitole, fiecare capitol terminîndu-se cu o vastă bibliografie.

Primul capitol se referă la aplicarea și indicația substanțelor psihofarmacologic active cu referire specială la situația din R. F. a Germaniei. Sînt tratate pe rînd substanțele tranchilizante, neuroleptice, antiparkinsoniene, antidepresive, psihostimulatoare, hipnotice și analgetice, dîndu-se și definițiile obișnuinței, a alcoolismului, debilității, imbecilității, idioției și psihoterapiei îmbătrînirii.

Al doilea capitol este consacrat diagnozei și tratamentului stărilor depresive și se încheie cu caracterizarea succintă a diferitelor forme de stări depresive și psihoze.

Al treilea capitol tratează despre substanțe neuroleptice, modul lor de acțiune, posologia, avantaje și desavantaje neurolepticilor cu acțiune slabă sau puternică, reacții alergice, indicații cu privire la folosirea testului scrisului de mînă etc. Capitolul se încheie cu definirea noțiunii de substanțe neuroleptice și de termenele tehnice legate de activitatea și folosirea lor.

Cel de al patrulea capitol se referă la starea actuală în farmacoterapia schizofreniilor cu referire specială la tratamentul staționar și la post-tratamentul ambulatoriu. Capitolul se încheie cu o caracterizare succintă a schizofreniei și formelor ei de manifestare.

Capitolul cinci, tratează despre aplicarea substanțelor psihofarmacologic active în diferite afecțiuni și îmbolnăviri ale organismului. Sînt tratate pe rînd aplicarea acestor substanțe în anestezie, chirurgie, dermatologie, genecologie, ORL, pediatrie, neurologie, oftalmologie și ortopedie.

Capitolul al şaselea dă modele de alcătuire a fişelor destinate pentru informarea pacienţilor, a rudelor lor şi medicului în cazul diferitelor afecţiuni psihice şi la folosirea diferitelor preparate psihotrope.

Capitolul al şaptelea tratează despre stările critice în psihiatrie şi neurologie, precum şi despre simptomatica şi terapia la intoxicări acute şi la tentative de sinucidere.

Al optulea capitol, indică căi noi pentru reducerea recidivelor la perturbări psihice.

Capitolul nouă, este consacrat tratamentului farmacologic al celor deveniţi dependenţi de droguri.

În sfîrşit, capitolul zece, tratează despre substanţe psihofarmacologic active în viziunea clinico-farmacologică şi se referă pe de o parte la aspecte chimice, farmacologice şi farmacocinetice şi pe de altă parte, la interferenţele dintre medicamente.

Un index cu denumirile comerciale ale preparatelor psihotrope însoţite de numele lor generic, un index cu denumirile generice ale substanţelor neuroleptice, tranchilizante şi antidepresive şi un index alfabetic pe subiecte, încheie această carte extrem de valoroasă pentru toţi cei care lucrează în domeniul psihofarmacoterapiei.

Horst D. Schell

R. DARGEL, W. GRAF, *Lehrprogramme der Funktionellen Biochemie* (Programm de învăţămînt pentru biochimia funcţională)

Teil 3. *Stoffwechsel der Kohlenhydrate* (Metabolismul hidraţilor de carbon), H.— P. Kleber, 1976, 130 pag.

Teil 4. *Stoffwechsel der Lipide* (Metabolismul lipidelor), H. — P. Kleber, *Eiweiss-und Aminosäurestoffwechsel* (Metabolismul proteinelor şi aminoacizilor), P. Klossek, 1977, 152 pag.

Teil. 5. *Biochemische Genetik. Proteinbiosynthese* (Genetică biochimică. Sinteza proteinelor), R. Dargel, 1977, 135 pag. Editura VEB Gustav Fischer, Jena

Programele de învăţămînt pentru biochimia funcţională sînt rezultatul unei activităţi didactice îndelungate cu studenţii de la medicină, biologie şi biochimie. Volumele elaborate au ca scop înlesnirea însuşirii materialului dintr-un capitol deosebit de important al biochimiei, permiţînd totodată şi un control permanent asupra celor învăţate. După însuşirea materialului cuprins în aceste programe de învăţămînt, studentul poate face faţă fără greutăţi problemelor ivite ulterior în studiile sale de specialitate legate, de pildă, de biochimia diferitelor organe sau de biochimia medicală.

Diferitele capitole ale biochimiei funcţionale sînt tratate în volume separate, amintite mai sus, şi scrise de diferiţi autori într-o formă foarte clară şi concisă şi cu multe exemple şi mecanisme de reacţie bine alese.

Astfel, volumul 3, este consacrat metabolismului hidraţilor de carbon şi cuprinde reacţiile glicolizei şi gluconeogenezei, sinteza şi degradarea glicogenului, ciclul oxidativ al pentozofosfaţilor. Cartea se încheie cu o trecere în revistă a celor mai importante noţiuni caracterizate pe scurt şi cu index alfabetic pe subiecte.

Volumul 4, cuprinde metabolismul lipidelor, proteinelor şi aminoacizilor. Prima parte prezintă în mod foarte sistematizat şi explicit aspecte ca oxidarea acizilor graşi, metabolismul corpilor cetonici, al lipidelor complexe şi steroizilor precum şi mecanismele de sinteză a acizilor graşi. Cea de a doua parte, se referă mai ales la degradarea proteinelor şi aminoacizilor, ciclul urogenetic şi la metabolismul corpilor monocarbonici.

Ambele părţi se încheie cu o scurtă prezentare şi explicare a noţiunilor de bază din cele două aspecte ale metabolismului intermediar tratate în acest volum.

Volumul 5, este consacrat biochimiei genetice şi biosintezei proteinelor şi tratează aspecte ca : ADN ca purtătorul de informaţie genetică, replicarea ADN, reglarea activităţii genetice şi altele. O scurtă trecere în revistă a noţiunilor principale din acest domeniu şi o tabelă cu codul genetic încheie acest volum.

Ca încheiere, amintim cu această ocazie, că primele două volume din această serie au fost recenzate într-un număr anterior al revistei şi se referă la bioenergetica şi cinetica reacţiilor chimice; enzimologie (vol. 1) şi la oxidarea biologică şi ciclul acidului citric (vol. 2).

Horst D. Schell

Intelligenz, Lernen und Leunstörungen. Theorie, Praixis und Therapie. (Inteligență, învățare și perturbații ale învățării. Teorie, practică și terapie), editat de G. Nissen, ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 73 fig., 202 pag.

Problemele legate de inteligență și capacitatea de însușirea cunoștințelor ocupă în prezent un loc important în cercetările unui mare număr de specialiști din cele mai diferite domenii. Aceste cercetări au fost impulsionate mai ales și datorită faptului că numărul copiilor cu perturbări la învățare și greutăți la școală este în continuă creștere.

Prezenta carte cuprinde materialele unui simpozion multidisciplinar care a avut loc. în toamna anului 1976, la Frankfurt/Main, la care au participat biologi, chimiști, geneticieni, psihiatri, psihologi, pshioterapeuți și specialiști din alte domenii înrudite, cu renume mondial.

Cartea cuprinde trei capitole. Primul capitol, consacrat bazelor învățării, tratează aspecte ca bazele genetice, etiologia, neuropsihologia și biochimia învățării, plasticitatea spinală, învățarea și reactivitatea farmacologică, aspecte neurologice ale învățării și altele. Capitolul II este consacrat dezvoltării capacității de a învăța și tratează aspecte ca dezvoltarea învățării la sugari, rolul exemplului și al limbii în procesul de învățare la copii, învățarea, motivația și structura societății, determinarea și tratamentul perturbărilor de învățare etc. Ultimul capitol tratează despre aspectele clinice și terapeutice a perturbărilor de învățare și anume: perturbări neurotice și tratamentul lor, suprasolicitarea în școală, cauzele și terapia eșecurilor la școală, perturbații posttraumatice de învățare în vîrsta copilăriei și tratamentul lor, posibilități de obiectivizare a terapiei perturbațiilor de învățare, diagnosticarea și tratamentul problemelor de învățare în cazul unor deficiențe perceptual-motorie etc.

Prezenta colecție de articole scrise clar și concis, cu referiri la cele mai recente articole de specialitate, se adresează mai ales psihiatrilor, psihologilor, pedagogilor, neurologilor, psihoterapeuților de copii și studenților cu specializări în aceste domenii.

Horst D. Schell

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică* în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicație, etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78 București 2, P.O.B. 1002.

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ce: *Viața științifică* în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicație, etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție: 78 București 2, P.O.B. 1002.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p. 2 pl., 8 lei.

P RAICU, M. IONESCU-VARO, G. DANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

V. I. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, **Chimia algelor marine**, 1974, 212 p., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU, **Istoria ştiinţelor în România — Biologia**, 1975, 287 pl., 13,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 21, NR. 1, P. 1—130, BUCUREŞTI, IANUARIE—IUNIE, 1978

1978 MAI 9

I. P. Informaţia — c. 75

43 816

Lei 20.—

F 1330

66

studii și cercetări de biochimie

2

TOMUL 21

1978

IULIE—DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 21, nr. 2, p. 131—242, 1978, București

SCBIAS—21 (2), 1978

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136—137 telex: 11226, București 70116, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, P. O. Box 1002, București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București 71021, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 21, nr. 2 1978

IULIE—DECEMBRIE

1978 DEC 16

SUMAR

MARIA ANDRAŞ, CECILIA MOTAŞ, Comportarea glutamat-dehidrogenazei la tripsinoliză limitată 133

LUCIA BUZILĂ, FLORICA MIHALCU, CECILIA MOTAŞ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a glicoproteinelor. V. Tripsinoliza componentei secretoare (SC) tratată cu glicozidaze din *Diplococcus pneumoniae* 137

L. M. BURUIANĂ, ANA GHEORGHIU, M. A. MOHRAN, Variaţia zimogramei fosfatazelor şi peroxidazei din lapte, în funcţie de productivitatea vacilor . . 143

R. CIUPE, ILEANA FUNDUC, DANIELA TĂPĂLAGĂ, Determinarea gaz-cromatografică a acizilor biliari din bilă 151

SIMONA CEAUŞESCU, LUIZA SCHIOIU, N. STĂNCIOIU, ANI POBORAN, FL. CUCU, Compoziţia chimică a grăsimii de depozit la vertebrate ; semnificaţia biologică şi terapeutică 157

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, CECILIA MOTAŞ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a glicoproteinelor. VI. Tripsinoliza imunoglobulinei *A* secretoare (SIgA) tratată cu glicozidaze din *Diplococcus pneumoniae* 163

A. S. JABBAR, Interacţiunea anticorpilor citofili din clasa IgG cu receptorii Fc ai limfocitelor 169

MARIA MÎRZA, M. ŞERBAN, Supravieţuirea şi modificări biochimice la *Mytilus galloprovincialis* Lmk. sub acţiunea şocului de temperaturi crescute 175

CONSTANŢA MUŞOLAN, Acţiunea dodecilsulfatului de sodiu asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb 183

CONSTANŢA MUŞOLAN, Acţiunea dodecilsulfatului de sodiu asupra acizilor nucleici din frunzele de orz 189

FLOARE ROTTENBERG, Determinarea conductivităţii molare a gelatinei în funcţie de concentraţie şi temperatură 193

REFERAT GENERAL

H. D. SCHELL, Cromatografia de afinitate. Principii teoretice şi aplicaţii practice 199

RECENZII 219

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 21, nr. 2 1978

IULIE – DECEMBRIE

CONTENTS

MARIA ANDRAŞ, CECILIA MOTAŞ, The limited trypsinolysis of glutamate dehydrogenase 133

LUCIA BUZILĂ, FLORICA MIHALCU, CECILIA MOTAŞ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. V. Trypsinolysis of SC treated with pneumococcal glycosidases 137

L. M. BURUIANĂ, ANA GHEORGHIU, M. A. MOHRAN, The variation of phosphatases and peroxidase zymograms of cow milk, in function of their yield . 143

R. CIUPE, ILEANA FUNDUC, DANIELA TĂPĂLAGĂ, Die gas-chromatographische bestimmung von gallensäuren aus der galle 151

SIMONA CEAUŞESCU, LUIZA SCHIOIU, N. STĂNCIOIU, ANI POBORAN, FL. CUCU, The chemical composition of deposited fat in vertebrates : its biological and therapeutic significance 157

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, CECILIA MOTAŞ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. VI. Trypsinolysis of SIgA treated with pneumococcal glycosidases 163

A. S. JABBAR, The interaction of cytophilic IgG antibodies with lymphocyte Fc receptors 169

MARIA MÎRZA, M. ŞERBAN, The survival and biochemical transformations of *Mytilus galloprovincialis* Lmk under high temperatures shocks . . . 175

CONSTANŢA MUŞOLAN, The action of sodium dodecylsulfate on the nucleic acids in maize leaves 183

CONSTANŢA MUŞOLAN, The action of sodium dodecylsulfate on the nucleic acids in barley leaves 189

FLOARE ROTTENBERG, Determination of molar conductivity of gelatine depending on concentration and temperature 193

GENERAL REVIEWS

H. D. SCHELL, Affinitätschromatographie in Theorie und Praxis. 199

REVIEWS 219

COMPORTAREA GLUTAMAT-DEHIDROGENAZEI LA TRIPSINOLIZĂ LIMITATĂ

MARIA ANDRAŞ, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. S-a studiat comportarea glutamat-dehidrogenazei (EC. 1.4.1.3) ca proteină şi ca activitate enzimatică după tripsinoliză limitată, prin disc-electroforeză, imunoelectroforeză şi imunoelectroforeză încrucişată
Prin imunoelectroforeză încrucişată s-a constatat o micşorare a cantităţii de proteină cu 40% faţă de martor, cu o micşorare proporţională a activităţii enzimatice. Prin disc-electroforeză s-a obţinut o creştere a activităţii enzimatice a aceleiaşi cantităţi de proteină redusă cu 40%, faţă de martor.

Glutamat-dehidrogenaza este o enzimă cu masa moleculară de 300 000—350 000. După Frieden (1) este un tetramer cu o greutate moleculară de 250 000 care disociază reversibil în monomeri. Ulterior Appella şi Tomkins (2) au demonstrat că este un hexamer, iar în 1972, Bell şi Dalziel (3) au propus ipoteza formării hexamerului din doi trimeri distincţi funcţionali.

Recent s-a sugerat, de către Rasool şi colab. (4) că activitatea enzimatică este distribuită asimetric între cele 6 subunităţi ale glutamat-dehidrogenazei, şi anume : trei conţin 82% şi trei numai 18% din activitatea totală.

Glutamat-dehidrogeneza fiind deci o enzimă de greutate moleculară mare şi cu implicaţii deosebit de multiple în metabolismul celular (5), am luat-o ca model de studiu.

Deoarece preparatul de glutamat-dehidrogenază Sigma întrebuinţat de noi, era foarte impur (dădea 6 linii de precipitare cu serul omolog obţinut de noi) ne-am propus folosirea tripsinolizei limitate ca etapă în procesul de purificare (6).

Asimetria repartiţiei activităţii enzimatice ne-a sugerat posibilitatea întrebuinţării tripsinolizei limitate şi ca etapă în procesul de reducere a antigenicităţii moleculei proteice cu menţinerea activităţii enzimatice.

Am practicat această tripsinoliză limitată avînd în vedere şi posibilitatea ulterioară de întrebuinţare a enzimei purificate în terapeutică.

MATERIAL ŞI METODE

Glutamat-dehidrogenaza, folosită a fost un preparat Sigma, de ficat de vită, 10 mg proteină/ml, în tampon fosfat de sodiu pH = 7,4 cu glicerol 50%.

Hidroliza cu tripsină, s-a făcut în raportul glutamat-dehidrogeneza/tripsină, de 50/1, în tampon TRIS—HCl, 0,1 M, pH= 8, care conţinea $CaCl_2$ 0,02 M, timp de 5 min. şi respectiv 10 min. Probele au fost aplicate imediat după terminarea timpului de hidroliză.

Disc -electroforeza în gel de poliacrilamidă a fost făcută după Davis (7). După electroforeză gelurile au fost colorate pentru proteine cu Amidoschwartz 1 %.

Pentru *evidenţierea activităţii enzimatice*, gelurile s-au incubat timp de 30 min. la 37°C într-un amestec format din : 34 mg glutamat de sodiu, 20 mg NAD, 10 mg nitroblue tetrazolium, 0,5 mg fenazin-metasulfat, adus la 25 ml cu tampon TRIS-HCl 0,1 pH = 9 (8).

Prepararea serurilor imune anti-glutamat-dehidrogenază s-a făcut pe iepuri. Antigenul (1 mg adus în părţi egale cu adjuvant Freund complet) s-a administrat în două reprize a cîte 10 injecţii interdermice la interval de două spătămîni. La 10 zile după ultima injecţie animalele s-au sîngerat la alb.

Imunoelectroforeza în gel de agroză s-a făcut în tampon veronal- veronal sodic, de pH = 8,6 şi μ = 0,05 (9).

Pentru evidenţierea activităţii enzimatice plăcile s-au incubat în acelaşi amestec şi în acelaşi condiţii ca în cazul disc-electroforezei. (8).

Imunoelectroforeza încrucişată, s-a făcut după Ganrot (10) în gel de agaroză 1 %, folosindu-se acelaşi tampon ca la imunoelectroforeză. Timpul de migrare a fost de 3 ore atît într-un sens cît şi în celălalt sens. Concentraţia antiserului înglobat în agaroză a fost 1/10.

Evaluările cantitative s-au făcut desenîndu-se pe hîrtie de calc imaginea obţinută pe placă şi apoi decupînd suprafeţele „clopotelor" proteice şi cîntărindu-le (11).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Urmărindu-se comportarea la disc-electroforeză a glutamat-dehidrogenezei purificate, comerciale, s-a constatat după colorarea pentru proteine apariţia unei fracţiuni puternice, apropiată de start, precum şi a încă 3—4 fracţiuni de precipitare, mai anodice (fig. 1*a*). După 5 min. de tripsinoliză, viteza de migrare a fracţiunii majore este mai mare, ea devenind mai bine delimitată. Apar în plus încă 6 fracţiuni cu diferite viteze de migrare anodice (fig. 1*b*). După 10 min. de tripsinoliză vitezele de migrare devin mai mari, denotînd fie o micşorare a greutăţii moleculare a fracţiunii majore, fie o modificare a sarcinii electrice. Fracţiunile anodice prezintă probabil impurităţi ale preparatului de enzimă care în urma tripsinolizei se modifică şi ele (fig. 1*c*). Apar în plus faţă de martori încă 2—3 benzi care provin din scindarea celorlalte, cu mare probabilitate din fracţiunea majoră.

Deoarece după tripsinoliza de 10 min., nu apar modificări deosebite ale fracţiunii majore, în continuare nu am mai întrebuinţat decît tripsinoliza de 5 min.

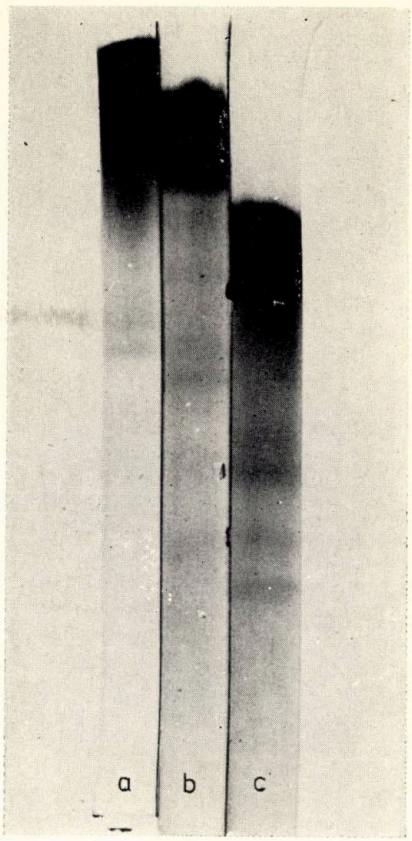
Pentru a constata repartiţia activităţii enzimatice pe fracţiunile proteice, s-au evidenţiat activităţile enzimatice pe gel.

Se constată înainte de tripsinoliză o activitate redusă (fig. 2*a*), cu o intensificare extrem de mare, după tripsinoliză (fig. 2*b*). Vitezele de migrare corespund fracţiunii majore de la proteine (fig. 1*a*, fig. 1*b*) confirmînd astfel supoziţia că această proteină corespunde glutamat-dehidrogenazei.

Reacţia cu serul imun specific, la imunoelectroforeză, denotă 5—6 linii de precipitare, din care 3 principale (fig. 3*a*). După tripsinoliza de 5 min. vitezele lor de migrare nu se modifică ca la disc-electroforeză (fig. 1*b*). Rezultatele deosebite obţinute prin cele 2 metode indică o micşorare a greutăţii moleculare, şi nu o modificare a încărcării electrice, care ar fi trebuit să fie sesizată de ambele metode.

La imunoelectroforeza probei tratate cu tripsină nu se mai observă decît cele trei linii majore (fig. 3*b*).

Fig. 1. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a glutamat-dehidrogenazei (GLDH), tratată cu tripsină (colorare pentru proteine)
a) GLDH-ază
b) GLDH-ază + tripsină : 5 min.
c) GLDH-ază + tripsină : 10 min.



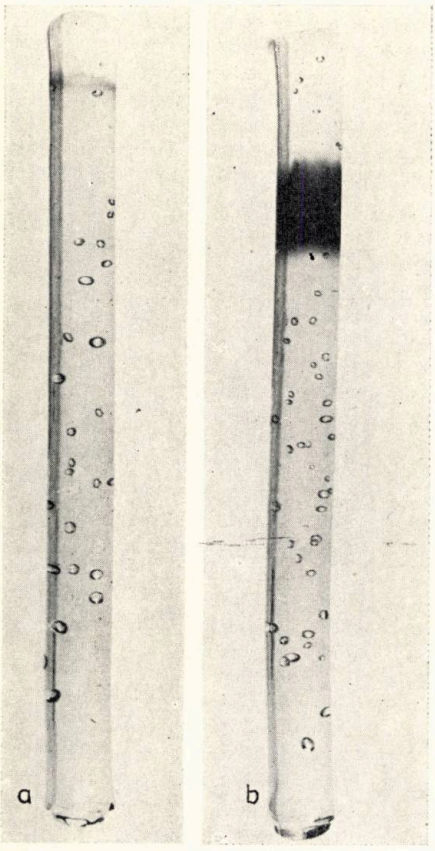


Fig. 2. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a glutamat-dehidrogenazei, tratată cu tripsină (colorare pentru activitate enzimatică).
a) GLDH-ază
b) GLDH-ază + tripsină : 5 min.

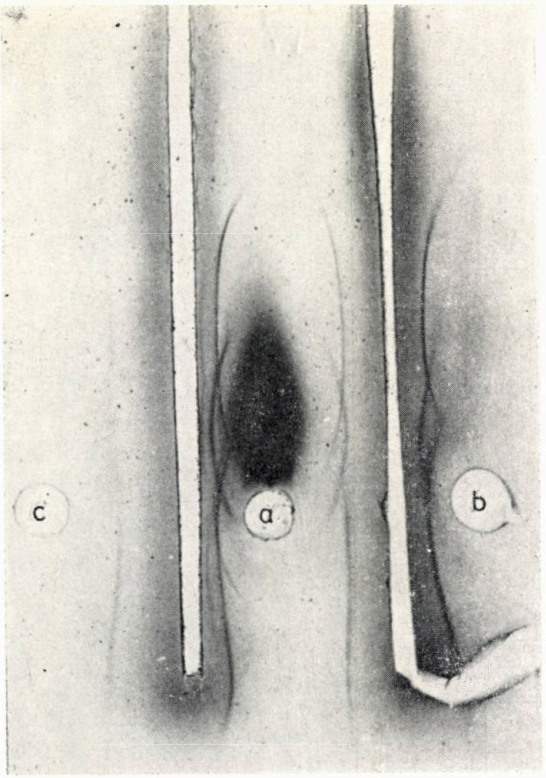


Fig. 3. — Imunoelectroforeza glutamat-dehidrogenazei tratată cu tripsină (colorare pentru proteine).
a) GLDH-ază
b) GLDH-ază + tripsină : 5 min.
c) GLDH-ază + tripsină : 10 min.

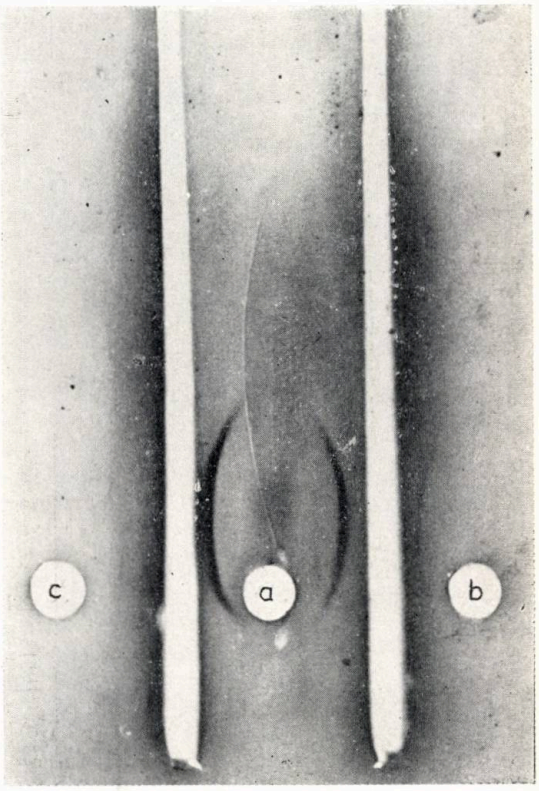
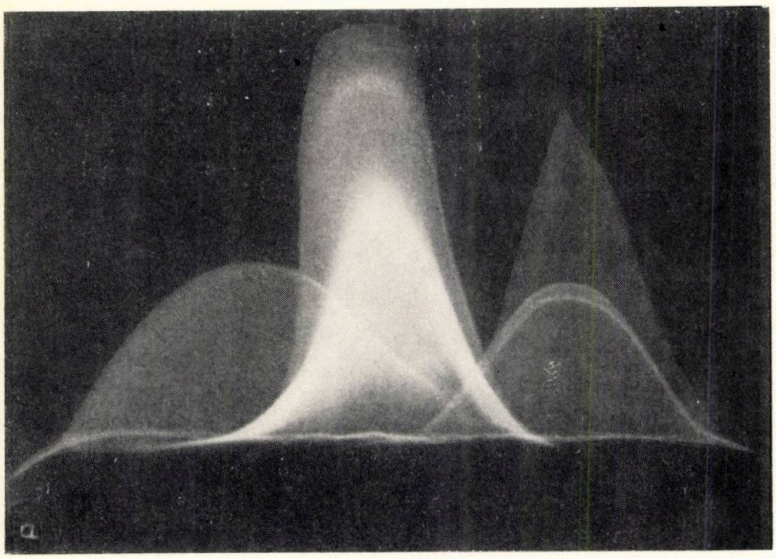
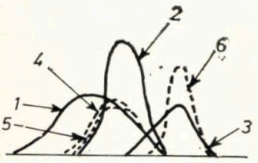
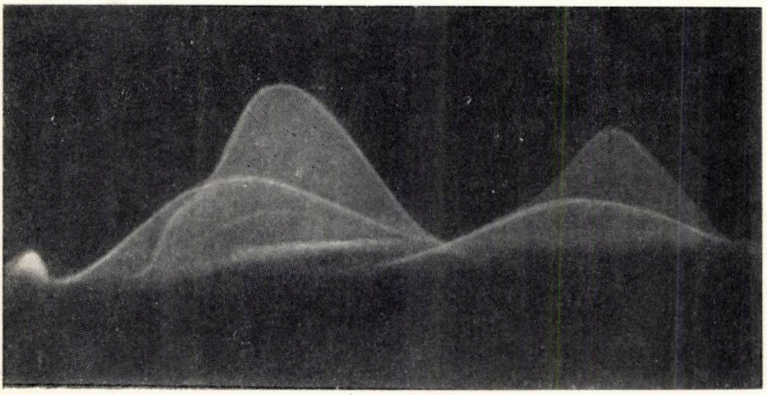


Fig. 4. — Imunoelectroforeza glutamat-dehidrogenazei tratată cu tripsină (colorare pentru activitate enzimatică).
a) GLDH-ază
b) GLDH-ază + tripsină : 5 min.
c) GLDH-ază + tripsină : 10 min.







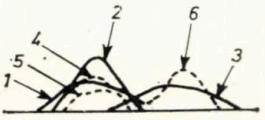


Fig. 5. — Imunoelectroforeza încrucișată a glutamat-dehidrogenazei tratată cu tripsină.
a) GLDH-ază
b) GLDH-ază + tripsină : 5 min.

La colorarea pentru activitate enzimatică a liniilor de precipitare, nu se obține decît o singură linie colorată (fig. 4*a*). După tripsinoliza de 5 min. colorarea ei a fost mult mai slabă (fig. 4*b*).

Deoarece după tripsinoliză, la disc-electroforeza activitatea enzimatică era mult crescută față de martor, pe cînd la imunoelectroforeză era mai scăzută, am vrut să verificăm modificările cantitative ale proteinelor din preparatul enzimatic. În acest scop am practicat imunoelectroforeza încrucișată.

Se constată la preparatul enzimatic prezența celor șase proteine sesizate și prin disc-electroforeză (fig. 5*a*). După tripsinoliza de 5 min, toate „clopotele" de precipitare s-au micșorat notabil (fig. 5*b*).

După colorarea pentru activitate enzimatică s-a constatat că enzima este prezentă numai în „clopotul" de precipitare de la mijloc (clopotul 2). Calculînd suprafața „clopotului" după tripsinoliză se constată o micșorare cu 39% față de martor. Deci, colorarea pentru activitate enzimatică după reacțiile imune a fost cea care a dat o indicație concordantă cu dispariția unei cantități echivalente cu aproximativ 40% din cea dată de enzima martor.

Rezultatul de la disc-electroforeză a fost complet diferit. Era de presupus că raportul enzimă/substrat în proba martor nu a fost cel optim, pe cînd după tripsinoliză s-a realizat un raport potrivit. Pentru a confirma acest lucru, am trecut proba martor în mai multe diluții, apropiate de concentrația presupusă după tripsinoliză. Nu am sesizat, la nici o diluție, o activitate atît de mare ca cea obținută după tripsinoliza limitată.

Micșorarea „clopotelor" de precipitare după tripsinoliză și mai ales a „clopotului" glutamat-dehidrogenazei, cu 40%, denotă o micșorare a cantității de proteină cu activitate enzimatică. Activitatea enzimatică este concordantă cu această cantitate redusă de proteină.

Activitatea enzimatică evidențiată prin disc-electroforeză după tripsinoliză este dată de aceeași cantitate redusă de enzimă ca mai sus. Creșterea excesiv de mare a activității enzimatice nu poate demonstra decît o activare a enzimei în urma tripsinolizei, în condiții de determinare specifice disc-electroforezei.

Din rezultatele reacțiilor imune reiese că odată cu reducerea cantității impurităților proteice, se reduce proporțional și cantitatea de proteine cu activitate enzimatică. Reiese că tripsinoliza limitată nu este indicată ca etapă în procesul de purificare a enzimei.

Totuși, tripsinoliza poate fi întrebuințată ca etapă în procesul de purificare a glutamat-dehidrogenazei, dacă ulterior activitatea ei va fi determinată prin disc-electroforeză.

Rezultatele obținute prin reacțiile imune au arătat că tripsinoliza nu reușește să scindeze cei trei monomeri cu 18% activitate enzimatică, pentru a reduce antigenicitatea concomitent cu menținerea a 82% din activitatea enzimatică. Rezultatele de la disc-electroforeză, prin activarea puternică a enzimei după tripsinoliză limitată, pun sub semnul îndoielii această imposibilitate. Prin metodele întrebuințate de noi nu am putut ajunge la o concluzie sigură în această direcție.

Prezentat la redacție
la 21 iunie 1978

Institutul de Științe Biologice,
București, Spl. Independenței 296
Sector 7

THE LIMITED TRYPSINOLYSIS OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE

SUMMARY

Glutamate dehydrogenase was investigated for its behavior in limitted trypsinolysis, in terms of its protein and enzyme characteristics, by means of disk electrophoresis, immunoelectrophoresis and crossimmunoelectrophoresis. The treated enzyme showed by crossimmunoelectrophoresis a 40% decrease of the protein amount, accompanied by a corresponding decrease of enzyme activity. The same 40% decreased protein showed by disk electrophoresis an increased enzymatic activity, as compared with controls.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Frieden, J. Biol. Chem., *238*, 3286 (1963).
2. E. Appella, G. M. Tomkins, J. Mol. Biol., *18*, 77 (1966).
3. E. J. Bell, K. Dalziel, Biochim. Biophys. Acta, *309*, 237 (1972).
4. C. G. Rasool, S. Nicolaidis, M. Achta, Biochem., J., *157*, 675 (1976).
5. S. D. Bendall, C. D. Duve, Biochem. J., *74*, 444 (1960).
6. H. Wacker, P. Lehky, E. H. Fischer, E. A. Stein, Helv. Chem. Acta, *54*, 473 (1971).
7. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., *121*, 404 (1964).
8. N. B. Lejohn, I. Suzuki, J. Biol. Chem., *243*, 118 (1968).
9. P. Grabar, P. Burtin, *Immunoelectrophoretic analysis*, Risedier, Amsterdam, London, New York, 3, 1964.
10. P. O. Ganrot, Scand J. Clin. Lab. Invest., *29*, Suppl. *124*, 39 (1972).
11. Doina Onica, Rev. roum. Biochim., *10*, 1, 49 (1973).

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A GLICOPROTEINELOR. V. TRIPSINOLIZA COMPONENTEI SECRETOARE (SC) TRATATĂ CU GLICOZIDAZE DIN *DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE*

LUCIA BUZILĂ, FLORICA MIHALCU*, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. Componenta secretoare (SC) izolată din colostrul uman a fost tratată cu endoglicozidaza din Diplococcus pneumoniae după care a fost supusă tratamentului cu tripsină. Modificările obţinute au fost urmărite în raport cu martorul (componenta secretoare netratată), prin : imunoelectroforeză, cross imunoelectroforeză şi electroforeza în disc în mediu alcalin şi în sodiu dodecil sulfat. Diferenţeno tabile s-au evidenţiat la coloraţia pentru glucide la electroforeza în disc precum şi la crossimunoelectroforeză. S-a ajuns la concluzia că odată cu îndepărtarea restului β-galactozidazic din molecula componentei secretoare conformaţia acesteia se schimbă în aşa fel încît ea devine rezistentă la hidroliza cu tripsină.

Componenta secretoare (SC) liberă este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 76000 care conţine aproximativ 12—15% din moleculă glucide (1) (2) (3). Studiile întreprinse pentru elucidarea rolului componentei secretoare au condus la ideea că această componentă conferă IgA secretoare (SIgA) rezistenţă la proteoliză (4) (5).

Deoarece s-a constatat că o serie de glicoproteine biologic active sînt rezistente la proteoliză (6) (7) am presupus că partea glucidică a componentei secretoare ar putea avea implicaţii în rezistenţa la proteoliză a SIgA. Aceasta, cu atît mai mult, cu cît SC, a cărei prezenţă în molecula SIgA conferă acesteia rezistenţă la proteoliză, este ea însăşi degradată rapid într-un fragment cu greutatea moleculară înjumătăţită, atunci cînd este expusă acţiunii enzimelor proteolitice sub forma ei liberă (8). SC ataşat în molecula SIgA rămîne neafectat de enzimele proteolitice în condiţiile în care SC liberă (FSC) era aproape complet degradată (8).

Îndepărtînd numai restul glucidic terminal, acidul sialic din molecula SIgA, s-au constatat modificări în comportarea la proteoliză la nivelul componentei secretoare, fără efect aparent asupra scindării moleculelor IgA dimere (9). Scindarea acidului sialic din molecula SC conduce la o comportare la proteoliză asemănătoare cu aceea a componentei secretoare intacte, cu mici diferenţe sesizabile datorită încărcării electrice diferite (10).

Pentru a putea determinarea implicarea posibilă a părţii glucidice a componentei secretoare în stabilitatea moleculei SIgA, am întrebuinţat un amestec glicozidazic din D. pneumoniae (11) pentru îndepărtarea par-

ţială a glucidelor din molecule. Ulterior am comparat comportarea la proteoliză a preparatului modificat faţă de acela nativ.

Deoarece îndepărtarea acidului neuraminic a dat rezultate diferite la SC, dependente de forma sub care a fost studiată liberă (FSC) sau legată (SIgA), am determinat în această lucrare comportarea la proteoliză a componentei secretoare liberă.

MATERIAL ŞI METODE

Izolarea şi purificarea componentei secretoare, s-a făcut din colostru uman obţinut de la maternitatea clinicii de ginecologie a spitalului Caritas, Bucureşti, de la femei la 2—3 zile postpartum. Colostrul a fost delipidat şi apoi decazeinificat prin acidifiere la pH 4,2 cu acid acetic 2% după care s-a centrifugat 30 min la 32000 g la 4°C.

Pentru izolarea şi purificarea componentei secretoare din colostrul decazeinificat s-a folosit metoda lui R. Newcomb (12) modificată de J. Mestecky (13).

Obţinerea endoglicozidazelor. În vederea obţinerii unui amestec glicozidazic format din β-galactozidază, exo- şi endo-β-N-acetilglucozaminidaze, neuraminidază şi glucozaminidază s-a lucrat cu o tulpină liofilizată (53148/Pasteur) de Diplococcus pneumoniae, tip I crescută la Institutul Cantacuzino după metoda lui Muramatsu (14). Purificarea ei s-a făcut după Koide şi Muramatsu (11).

Tratamentul cu endoglicozidază a fost făcut în tampon fosfat 0,1 M pH 6,2. Raportul enzimă substrat a fost 1 : 10. Incubarea s-a făcut la 37°C timp de 5 zile.

Dozarea zaharurilor s-a făcut după metoda Dubois (15).

Hidroliza cu tripsină s-a făcut după tratamentul componentei secretoare cu endoglicozidază aducîndu-se pH-ul soluţiei la 8 cu tampon TRIS/HCl 0,4 M pH 8. Raportul între tripsină şi componenta secretoare a fost 1/50. Pentru incubare probele au fost ţinute 18 ore la 37°C.

Electroforeza în disc de poliacrilamidă a fost făcută după Davis (16). După electroforeză discurile au fost colorate prin metodele uzuale atît pentru proteine cît şi pentru zaharuri.

Electroforeza în disc cu sodiu dodecil sulfat (SDS) a fost efectuată în condiţiile descrise de Weber şi Osborn (17).

Prepararea serurilor imune anticomponentă secretoare s-a făcut pe iepuri.Administrarea antigenului a avut loc în două reprize a cîte 10 injecţii intradermice. La o repriză s-au injectat 2 mg componentă secretoare în 0,5 ml ser fiziologic cu 0,5 ml adjuvant Freund complet Calbiochem. Intervalul între cele 2 reprize a fost de două săptămîni. La 10 zile după ultima injecţie, animalele s-au sîngerat din ureche pentru proba existenţei anticorpilor şi apoi s-au sîngerat la alb.

Imunoelectroforeza în gel de agaroză s-a făcut în tampon veronal-veronal sodiu cu o putere ionică de 0,05 şi un pH 8,6 după metoda lui Grabar (18).

Electroforeza încrucişată a fost făcută după Ganrot (19) în gel de agaroză 1% folosindu-se acelaşi tampon ca la imunoelectroforeză. Timpul de migrare a fost de 3 ore atît într-un sens cît şi în celălalt sens, utilizîndu-se 200 V şi 1 mA/cm. Concentraţia antiserului înglobat în agaroză a fost de 1/20.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Acţiunea glicozidazelor (20) s-a urmărit prin precipitarea probelor cu acid tricloracetic 12,5% şi determinarea ulterioară în supernatant a zaharurilor totale neutre după Dubois. S-au practicat şi probele de control care conţineau numai SC şi tampon, sau numai enzima singură. Rezultatele sînt date în tabela 1.

Reiese că endoglicozidaza eliberează foarte puţine glucide din componenta secretoare, la început în primele 48 ore.

Imunoelectroforeza preparatelor tratate cu glicozidaze, nu sesizează nici o modificare (fig. 1).

Tabela 1

Cantitatea de glucide eliberată din componenta secretoare de către amestecul glicozidazic exprimată în μg

Proba	24 ore	48 ore	120 ore
Comp. secret.	3	3	6
Comp. secret + enzimă	45	46	54
Enzimă ca atare	39	40	56

Hidroliza cu tripsină.

S-a lucrat cu 4 probe paralele :

1. componenta secretoare cu tampon, 138 ore, 37°C.
2. componenta secretoare cu glicozidaze, 138 ore, 37°C.
3. componenta secretoare cu glicozidaze, 120 ore, 37°C urmată de incubare cu tripsină 18 ore la 37°C.
4. componenta secretoare cu tampon 120 ore, 37°C, urmată de incubare cu tripsină 18 h la 37°C.

Urmărirea hidrolizei s-a făcut prin disc electroforeză la pH alcalin urmată de colorare pentru proteine şi pentru glucide, disc-electroforeza în SDS, electroforeza încrucişată.

Disc-electroforeza în mediu alcalin a celor 4 probe este redată în fig. 2. Coloraţia cu glucide confirmă rezultatele din tabela 1. Imaginea din fig. 2.2 *b* indică o slabă scădere a intensităţii benzii anodice a SC (fig. 2.1 *b*). În schimb tripsina tăind aproximativ o jumătate din molecula de SC (8) scindează glicopeptide, cantitatea de glucide scăzînd puternic după cum se vede în fig. 2.4 *b* atît din punct de vedere al intensităţii culorii cît şi a numărului de benzi electroforetice. Acţiunea tripsinei ulterioară intervenţiei glicozidazelor denotă sau o creştere a rezistenţei SC la acţiunea tripsinei prin pierderea celor cîteva resturi glucidice sau, o cuplare a unor glicozidaze, ele însăşi glicoproteine, cu SC, datorită capacităţii acesteia de a se combina prin interacţiuni necovalente puternice cu imunoglobulinele A sau M polimere (21) sau chiar cu unele IgA monomere (22) (fig. 2.3 *b*). Ultima supoziţie ar fi confirmată de coloraţia pentru proteine, intensitatea probei tratată cu glicozidaze fiind mult mai puternică decît la martor (fig. 2.2*a* şi 1 *a*). Acţiunea de hidroliză a tripsinei este confirmată şi la colorarea proteinelor (fig. 2.4*a*) prin scăderea intensităţii culorii.

Intervenţia tripsinei după glicozidaze (fig. 2.3*a*) este mai puţin activă decît pe molecula nativă (fig. 2.4 *a*), totuşi, intensitatea culorii este mai redusă decît a FSC tratată numai cu glicozidaze (fig. 2.2 *a*). Dacă supoziţia cuplării este adevărată, are loc concomitent şi un proces de tripsinoliză a glicozidazelor cuplate. Cum intensitatea de culoare este mai scăzută şi decît a SC nativă, a avut loc totuşi şi o mică hidroliză a SC (fig. 2.1 *a*) dar nu cu eliberare de glicopeptide ci doar de peptide (fig. 2.3 *b* şi fig. 2.1 *b*).

Electroforeza încrucişată (fig. 3), confirmă rezultatele de la electroforeză, tripsina dînd un fragment de SC care migrează deosebit de SC intactă dar dă reacţie cu serul imun anti—SC (fig. 3.4), rezultat asemănător cu acelea din lucrarea lui Kobayashi şi colab. (8) şi cu reacţia cu papaină (10). Tripsina adăugată probei SC tratată cu glicozidaze (fig. 3.3), confirmă

şi ea rezultatele de la disc-electroforeză în sensul unei hidrolize mult mai puţin intense decît la tripsină, forma şi înălţimea clopotelor fiind diferite, a probei 3 fiind practic asemănătoare cu a probei SC native (fig. 3.1).

Fig. 3.3 a probei tratate cu ambele enzime este complet diferită de a probei 3.1 din lucrarea anterioară (10) a probei tratate cu neuraminidază şi papaină.

Deosebirea nu se poate datora enzimei proteolitice schimbate, deoarece probele tratate numai cu enzima proteolitică, dau aproape aceeaşi imagine (fig. 3.4 şi fig. 3.2 din (10)). Rezultatele deosebite se pot datora modificării părţii glucidice, la restul anterior acidului neuraminic terminal prin acţiunea glicozidazelor din amestec.

Electroforeza în SDS, (fig. 4) confirmă întrutotul datele de mai sus glicozidazele modificînd SC nativă (fig. 4.2 şi 4.1), tripsina dînd mai multe fragmente de hidroliză (fig. 4.4) şi o viteză de migrare ceva mai mare. Acţiunea ambelor enzime menţine viteza de migrare a SC compactă, denotă un polimorfism mai accentuat a SC dar mai redus decît acela de la acţiunea tripsinei singură (fig. 4.3 şi 4.4)

Toate metodele întrebuinţate pentru sesizarea comportării la hidroliză a SC nativă sau modificată prin glicozidaze au dus la obţinerea unei mai mari rezistenţe la proteoliză în cazul SC modificat decît în stare nativă. Tratarea numai cu neuraminidază nu numai că nu conduce la asemenea rezultat, dar face molecula SC mai susceptibilă la acţiunea enzimelor proteolitice (10).

Rezultatele noastre ne sugerează apropierea de acelea obţinute de Morell şi colab., prin studierea dispariţiei rapide din circulaţie a asialoglicoproteinelor (22). Autorii au conferit această comportare resturilor galactozidice expuse prin tratarea glicoproteinelor cu neuraminidază.

Îndepărtarea lor prin acţiunea β-galactozidazei conduce la îndepărtarea lentă a glicoproteinelor din circulaţie, adică la întoarcerea la comportarea normală. Aceste efecte sînt generale pentru o mare varietate de glicoproteine serice (23). Ulterior s-a constatat că unitatea terminală galactozil este esenţială, dar nu este singurul factor ; este necesară o secvenţă oligozaharidică mult mai întinsă (24) care să fie recunoscută de receptorii de pe suprafaţa celulei hepatice.

Cu toate că SC nu este o proteină circulantă sanguină (poate doar cuplată cu IgM), nu este exclus ca în procesul de degradare „in vitro" să intervină un mecanism similar. Amestecul glicozidazic întrebuinţat de noi cuprindea atît neuraminidază, cît şi β-galactozidază pe lîngă endo- şi exo-N-acetilglucozaminidaza (25).

Cantitatea extrem de mică de glucide eliberate poate demonstra eliberarea doar a acidului sialic terminal şi a restului galactozidazic. Dacă după acţiunea neuraminidazei moleculele de SC devin mai reactive (9), lndepărtarea restului următor, β-galactozidul, conduce la SC mai rezistentă la proteoliză.

Aceste date sugerează posibilitatea ca în procesul de degradare „in vitro" a glicoproteinelor, partea glucidică să aibă un rol determinant în scindarea proteolitică a părţii proteice. Modificarea structurii glucidice atrage după sine o modificare a conformaţiilor proteice care ar conduce implicit la o scindare deosebită.

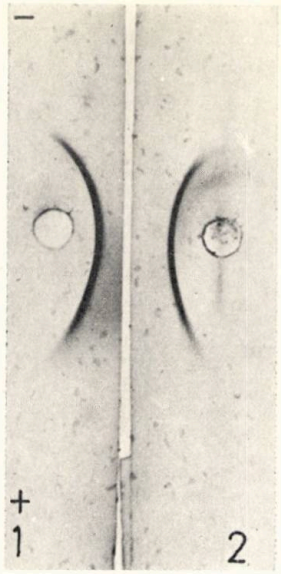
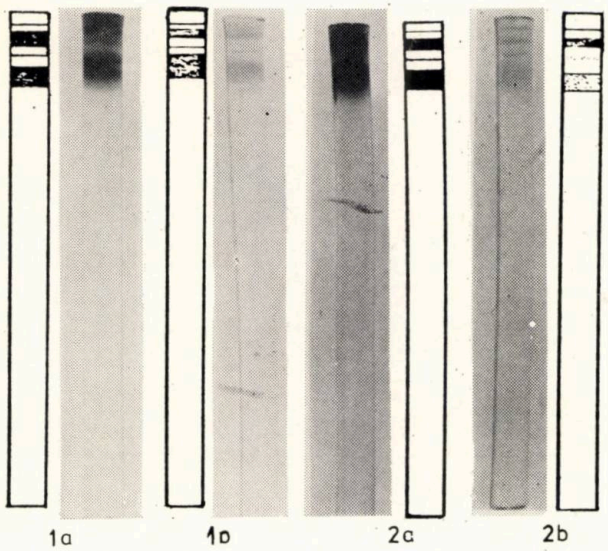


Fig. 1. — Imunoelectroforeza preparatelor: componenta secretoare (*1*) și componenta secretoare + endoglicozidază (*2*). În șanțuri de ser de iepure anticomponentă secretoare.



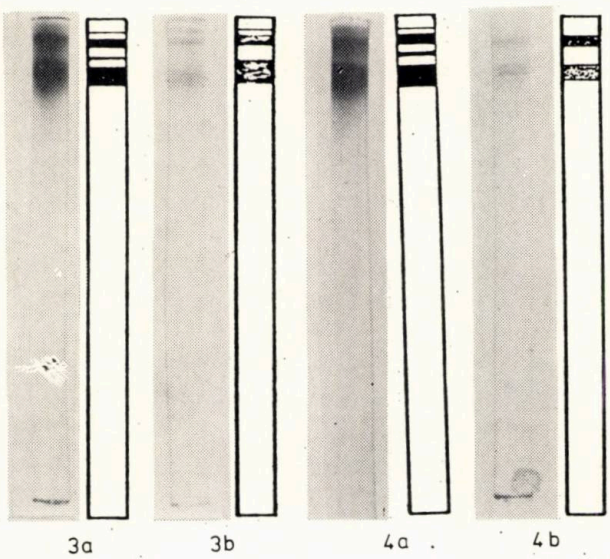


Fig. 2. — Electroforeza în disc de poliacrilamidă a celor 4 probe:
1 — componenta secretoare; *2* — componenta secretoare + endoglicozidază; *3* — componenta secretoare + endoglicozidază + tripsină; *4* — componenta secretoare + tripsină; *a* — colorare pentru proteine; *b* — colorare pentru glucide.

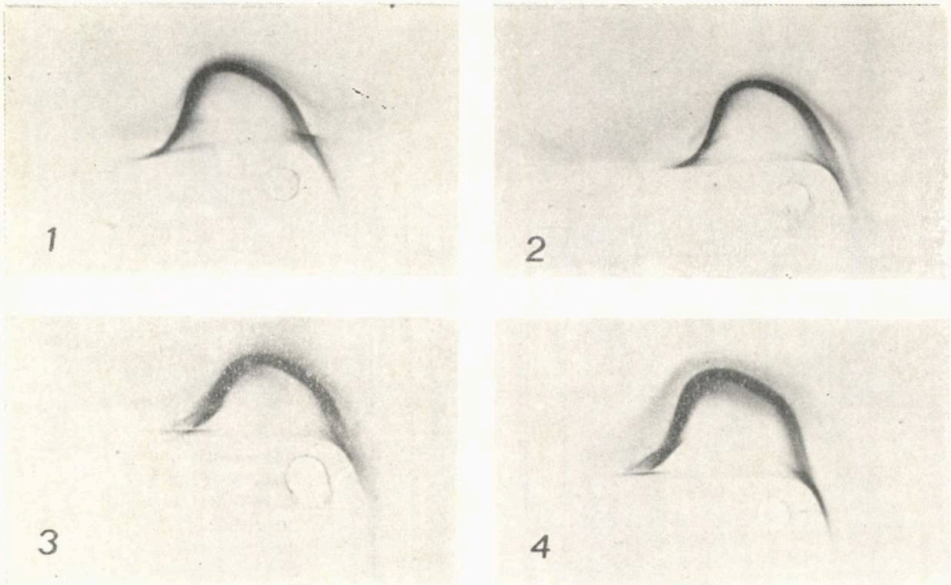


Fig. 3. — Electroforeza încrucișată a celor 4 probe :
1 — componenta secretoare ; *2* — componenta secretoare + endoglicozidază ; *3* — componenta secretoare + endoglicozidază + tripsină ; *4* — componenta secretoare + tripsină.

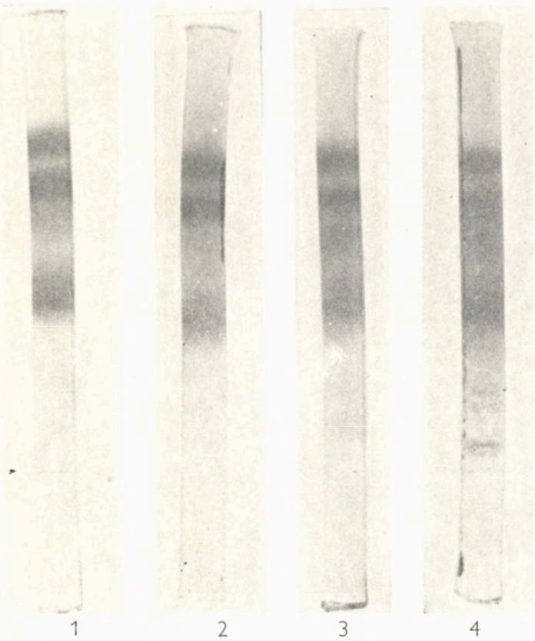


Fig. 4. — Electroforeza în disc de poliacrilamidă cu SDS *1* — componenta secretoare ; *2* — componenta secretoare + endoglicozidază ; *3* — componenta secretoare + endoglicozidază + tripsină ; *4* — componenta secretoare + tripsină.

CONCLUZII

Modificările care au loc prin acţiunea glicozidazelor din Diplococcus pneumoniae asupra componentei secretoare pledează pentru ruperea unor resturi glucidice după care probabil conformaţia SC se schimbă în aşa fel încît devine rezistentă la acţiunea tripsinei.

Prezentat la redacţie la
14 februarie 1978

Institutul de Ştiinţe Biologie, Departamentul de Biochimie, Colectivul de Proteine. Splaiul Independenţei 296, Bucureşti
**Institutul Cantacuzino, Splaiul Independenţei 101, Bucureşti*

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. V. TRYPSINOLYSIS OF SC TREATED WITH PNEUMOCOCCAL GLYCOSIDASES

SUMMARY

The effect of endoglicosidases isolated from Diplococcus pneumoniae on the trypsin hydrolysis pattern of secretory component was followed by disc-electrophoresis, immunoelectrophoresis, crosselectrophoresis and immunodifusion.

The alterations of secretory component (breaking of β-galactozid residue) pleads for a change of secretory component conformation so as it becomes resistent to the proteolytic action.

BIBLIOGRAFIE

1. P. J. J. von Munster, C. B. A. Stoelinga, J. R. Clamp, J. J. Th. Certing, J.C. Reijnen, Immunology, **24**, 249, 1972.
2. K. Kobayashi, Immunochemistry, **8**, 785, 1971.
3. M. Tomana, J. Mestecky, W. Niedermeier, J. Immunol., **108**, 1631, 1972.
4. W. R. Brown, R. W. Newcomb, K. Ishizaka, J. Clin, Invest., **49**, 1370, 1970.
5. V. Gheţie, G. Moţa, Immunochemistry, **10**, 839, 1973.
6. J. W. Coffey, C. de Dune, J. Biol. Chem., **243**, 3225, 1968.
7. E. Delvin, R. Gianetto, Biochim. Biophys. Acta, **320**, 93, 1970.
8. K. Kobayashi, J. P. Vaerman, J. F. Heremans, Immunochemistry, **10**, 73. 1973.
9. E. Ganea, C. Motas, Rev. Roum. Biochim., **12**, 29, 1975.
10. L. Buzilă, C. Motaş, Rev. Roum, Biochim., **14**, 155, 1977.
11. N. Koide, T. Muramatsu, J. Biol. Chem., **248**, 4897, 1974.
12. R. W. Newcomb, D. Normansell, D. R. Standworth, J. Immunol., **101**, 905, 1968.
13. J. Mestechky, R. Kulhavy, F. W. Kraus, J. Immunol., **108**, 738, 1972.
14. T. Muramatsu, J. Biol. Chem., **246**, 5535, 1971.
15. M. Dubois, K. A. Gilles, R. K. Hamilton, P. D. Rebers, T. Smith, Anal. Chem., **28**, 350, 1956.
16. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404, 1964.

17. R. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., **244**, 4406, 1969.
18. P. Grabar, P. Burtin, Immunoelectrophoretic analysis Elsevier Amsterdam, London, New York, 1964, p. 3.
19. P. O. Ganrot, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **29**, Suppl. **124**, 39, 1972.
20. A. L. Tarentino, F. Maley, J. Biol, Chem., **249**, 811, 1974.
21. T. Eskeland, P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **11**, 161, 1974.
22. A. G. Morell, G. Gregoriadis, I. H. Schertberg, J. Hickban, G. Ashwell, J. Biol. Chem., **246**, 1461, 1971.
23. R. L. Hudgin, W. E. Pricer, G. Ashwell, R. J. Stokert, A. G. Morell, J. Biol. Chem., **249**, 5536, 1974.
24. G. Ashwell, A. G. Morell, Adv. Enzymol., **41**, 99, 1974.
25. G. Ionescu, Z. Moldoveanu, I. Moisa, C. Motaş, Rev. Roum. Biochim., **14**, 19, 1977.

VARIAŢIA ZIMOGRAMEI FOSFATAZELOR ŞI PEROXIDAZEI DIN LAPTE ÎN FUNCŢIE DE PRODUCTIVITATEA VACILOR

L. M. BURUIANĂ, ANA GHEORGHIU şi MOHAMED ATTIEA MOHRAN

Rezumat. Fosfataza alcalină şi peroxidaza din laptele de vacă sînt enzime polimorfice cu zimograme tipice. Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă arată că numărul izozimelor fosfatazei alcaline din serul obţinut prin coagulare cu presură variază între 3 şi 5. Numărul izozimelor este mai mare la vacile cu o producţie ridicată de lapte decît la cele cu o producţie mai mică. Invers, numărul izozimelor peroxidazei din acelaşi ser de presură este mai mare (peste 18 izozime) în cazul laptelui provenind de la vacile cu o producţie mai mică de lapte decît la acelea cu producţie ridicată în care caz numărul izozimelor variază între 3 şi 8. Fosfataza acidă nu este polimorfică, prezentînd doar o singură fracţiune. Are un puternic caracter bazic, migrînd către catod în cazul electroforezei la pH 5. Aceeaşi fracţiune arată şi o puternică activitate peroxidazică. Se discută posibilitatea unor interreacţii între proteinele laptelui şi enzimele endogene, ceea ce ar putea explica diferitele constatări ca mult discutatul proces de reactivare a fosfatazei alcaline după pasteurizare.

Polimorfismul enzimatic este adesea corelat cu anumite caractere morfo-productive ale organismelor vii. Într-o serie de lucrări (1—6) s-a arătat că în cursul hibridării unor rase de animale, al iradierii cu raze X sau sub acţiunea unor factori de mediu, activitatea şi structura moleculară a unor enzime se modifică în mod caracteristic.

În lucrarea de faţă s-a cercetat cum variază polimorfismul unor enzime din laptele unor vaci cu productivitate diferită. S-au determinat în acest scop zimogramele fosfatazei (alcalină şi acidă) şi peroxidazei din laptele unor vaci din rasa Friză, de aceeaşi vîrstă şi în aceeaşi perioadă de lactaţie, unele avînd o producţie în jur de 4 000 litri lapte anual şi altele de 8 000 litri anual.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Izozimele fosfatazelor s-au determinat în laptele total degresat şi în serul respectiv obţinut prin coagulare cu presură sau cu acid acetic la punctul izoelectric al caseinei (pH 4,7). Faptul este justificat deoarece cercetări anterioare (7) au arătat că nu există nici o diferenţă între calităţile fosfatazei alcaline adsorbite de membrana globulelor de grăsime şi aceea din laptele smîntînit. Pe de altă parte, recent s-a constatat de noi că activitatea fosfatazei alcaline din laptele integral este egală cu aceea a serului obţinut după coagulare cu ajutorul presurei, spre deosebire de a serului acetic care este mult scăzută şi uneori chiar nulă.

Laptele analizat provenea din mulsoarea de dimineaţă şi era degresat prin centrifugare mai înainte de a fi utilizat la analiza electroforetică. Se dizolvau în acest scop 5 ml lapte în 1 ml NaOH N/1. Solvirea se poate face şi în prezenţa ureei, adăugînd peste 5 ml lapte 1 g uree pură şi numai 0,2 ml NaOH N/1. Proteinogramele sînt identice în ambele cazuri, iar ureea în condiţiile

---

Abreviaţiuni. P_M proteinograma laptelui degresat; P_{RS} proteinograma serului obţinut prin coagulare cu presură; P_{Ac} proteinograma serului acetic; I_{al} izozimele fosfatazei alcaline; I_{ac} izozimele fosfatazei acide; I_{Per} izozimele peroxidazei; $P - P$ zone cu migrare rapidă (fosfaţi, nucleotide etc.).

noastre de lucru nu influenţează activitatea enzimatică, după cum s-a verificat prin experimentări preliminare.

Serul de presură se obţinea în urma coagulării a 100 ml lapte cu 1 ml soluţie presură Hansen 1 %. Serul acetic se prepara coagulînd 100 ml lapte cu acid acetic 10 %, pH-ul final avînd valoarea 4,7. Se ţinea totul la 35°C în ambele cazuri pînă la exudarea unui ser limpede. Se decanta şi, dacă era nevoie, se centrifuga pentru a îndepărta eventualele cheaguri nesedimentate. Atît în laptele degresat cît şi în ser se determina conţinutul în proteină cu ajutorul reacţiei xantoproteice conform tehnicii lui L. M. Buruiană (8, 9). Această tehnică este foarte indicată pentru lapte şi produsele derivate. Metoda biuretului nu se poate aplica în cazul laptelui deoarece dă soluţii tulburi care nu se pot clarifica prin filtrare sau centrifugare şi deci imposibil de colorimetrat. Pentru electroforeză probele conţineau aceeaşi cantitate de proteină egal cu 0,400 mg.

Analiza electroforetică pentru separarea fracţiunilor proteice enzimatic active s-a efectuat în gel vertical (în tuburi de $5^{mm} \times 9^{cm}$) de poliacril amidă cu concentraţia 7,5 % în cazul migrării anodice la pH 8,6, conform tehnicii recomandate de B. J. Davies (10), şi în gel cu concentraţia 8,5 % în cazul migrării catodice, conform tehnicii lui L. M. Buruiană şi col. (11). Identificarea fracţiunilor proteice s-a făcut prin colorare cu negru amido 10 B şi decolorare prin spălări repetate cu o soluţie de acid acetic 7 %. Identificarea fracţiunilor cu activitate fosfatazică alcalină se făcea prin incubarea gelurilor scoase din tuburi cu o soluţie substrat cu compoziţia : 0,5 g beta-glicerofosfat, 0,61 g TRIS 0,5 g $CaCl_2$, 0,5 g $MgCl_2$ şi 10 ml HCl N/10 la 100 ml. Soluţia substrat astfel preparată arăta pH 9,4. Izozimele prezente erau puse în evidenţă prin apariţia unor benzi albe de fosfat de calciu. Timpul de apariţie variază cu activitatea enzimatică. Rezultatul definitiv se citeşte după circa 20 ore de păstrare la 37°C. Menţionăm că în cursul electroforezii în gel de poliacrilamidă la pH 8,6 se pot separa şi unele zone cu viteză de migrare mare şi care nu se colorează cu negrul amido. Ele dau rapid precipitate albe cu soluţia substrat fără glicerofosfat, putînd fi atribuite unor derivaţi ai acidului fosforic sau persulfatului utilizat la polimerizare. În zimogramele care urmează ele au fost notate cu $P - P$.

Fosfataza acidă se recunoaşte prin incubare cu soluţia substrat avînd compoziţia : 0,5 g alfa-glicerofosfat 0,2 g molibdat de sodiu 0,5 g $MgCl_2$ dizolvate în 100 ml tampon acetat-acid acetic M/10 cu pH 5,4 în care se adăuga 1 g acid ascorbic. În final soluţia substrat are pH 5,0.

Incubarea gelurilor se făcea tot 20 ore la 37°C. Prezenţa fosfatazei acide se evidenţia prin benzi albastre de fosfomolibdat redus.

Recunoaşterea izozimelor peroxidazei se făcea prin incubare cu o soluţie de benzidină ce conţinea apă oxigenată, cu compoziţia : 0,2 g benzidină bază, 3,0 g acetat de sodiu crist cu 3 H_2O, 5,0 ml acid acetic glacial şi 50 ml apă oxigenată 0,1 %, totul adus la 100 ml. Se recomandă ca acest reactiv să se prepare proaspăt sau numai după o scurtă păstrare în răcitor, la întuneric (4 — 5 zile). Fracţiunile cu activitate peroxidazică apar cu viteză variabilă, după intensitatea activităţii peroxidazice. Culoarea virează cu timpul de la albastru verde la verde-brun.

Gelurile colorate se pot păstra timp îndelungat la răcitor. La fel ca şi în cazul fosfatazei alcaline, se obţin benzi colorate care depăşesc fracţiunile proteice, corespunzătoare aceloraşi benzi cu migrare rapidă notate cu P—P. Ele se datoresc urmelor de persulfat neeliminate în cursul electroforezei.

REZULTATELE OBŢINUTE

În figura 1 sînt reprezentate proteinograma şi zimogramele fosfatazelor şi peroxidazei din laptele integral, degresat.

În figura 2 se reprezintă proteinograma şi zimogramele aceluiaşi lapte în cazul serului preparat prin coagulare cu presură.

Se remarcă că în acest caz se realizează o mai netă separare a izozimelor fosfatazei alcaline şi un număr mult sporit de izozime ale peroxidazei. Ele pot ajunge în unele cazuri la mai mult de 20. Analizele electroforetice al căror rezultat este reprezentat în figurile 1 şi 2 au fost efectuate cu laptele recoltat de la vaci a căror producţie oscila în jurul a 4 000 l/an.

În cazul cînd laptele provenea de la vaci a căror producţie era în jurul a 8 000 l/an numărul izozimelor fosfatazei alcaline era mai mare iar al izozimelor peroxidazei mai mic, aşa cum este redat în figura 3.

Dacă pentru analiza electroforetică se utilizează serul obţinut prin coagulare cu acid acetic, numărul şi poziţia fracţiunilor proteice sînt foarte asemănătoare sau identice cu acelea din cazul serului de presură. Separarea

izozimelor fosfatazei alcaline și ale peroxidazei este mai puțin netă, iar numărul lor mai mic, așa cum reise din figurile 4 și 5.

Se remarcă din aceste zimograme că fosfataza acidă este constituită dintr-o singură fracțiune care nu migrează în cursul electroforezei, rămînînd la originea spotului. În cazul cînd electroforeza se face în gel

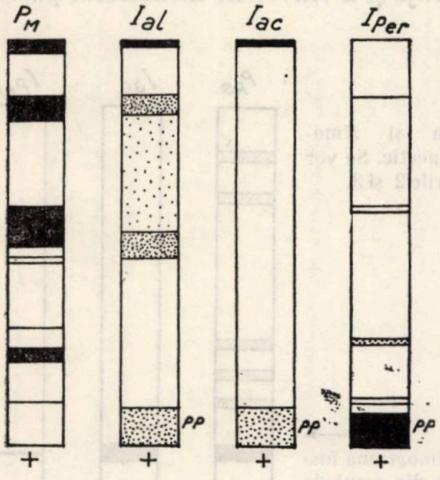


Fig. 1. — Proteinograma și zimogramele fosfatazelor și peroxidazei laptelui de vacă, degresat. Fracțiunile au fost separate cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă.

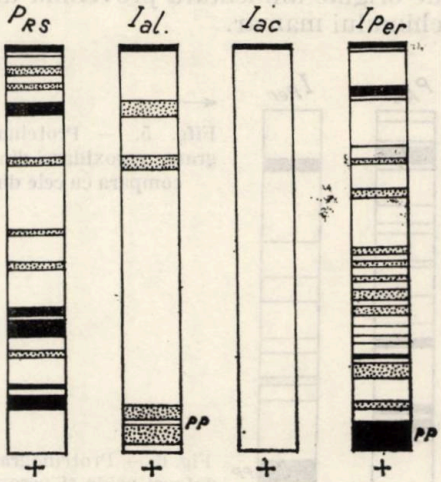


Fig. 2. — Proteinograma și zimogramele fosfatazelor și peroxidazei serului de lapte obținut prin coagulare cu presură. Cazul vacilor cu o producție de lapte în jur de 4 000 l/an.

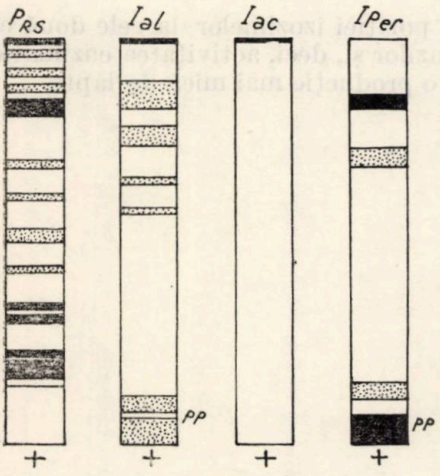


Fig. 3. — Proteinograma și zimogramele fosfatazelor și peroxidazei serului obținut prin coagulare cu presură. Cazul vacilor cu o producție de lapte în jur de 8 000 l/an.

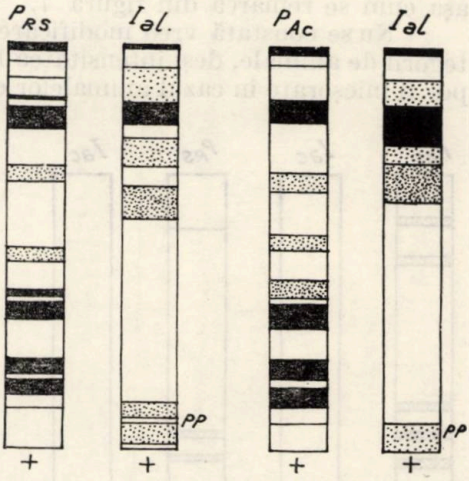
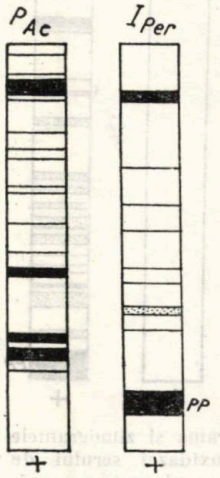


Fig. 4. — Deosebirea dintre proteinogramele și zimogramele fosfatazei alcaline a seului de lapte obținut prin coagulare cu presură și a celui obținut prin coagulare cu acid acetic.

de poliacrilamidă la pH 4,5, se constată că fosfataza acidă migrează rapid către catod, aşa cum este redat în figura 6.

Spre deosebire de fosfataza alcalină, cea acidă are un pronunţat caracter de proteină bazică. Numărul izozimelor este tot egal cu 1, ca şi în cazul migrării anodice. Mai întotdeauna această fracţiune prezintă şi o intensă activitate peroxidazică. Bănuim că proteina activă respectivă este de origine alimentară provenind din furaje şi a traversat membrana parenchimului mamar.



Fifg. 5. — Proteinograma şi zimograma peroxidazei din serul acetic. Se vor compara cu cele din figurile 2 şi 3.

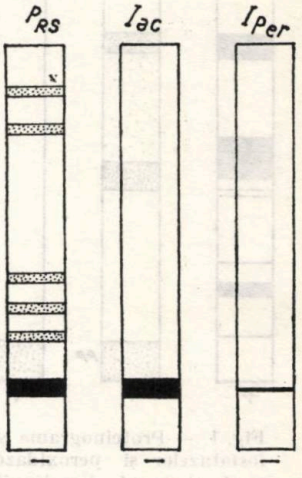


Fig. 6. — Proteinograma, zimograma fosfatazei acide şi peroxidazei din serul de presură, în cazul electroforezei la pH 5,0, migrare catodică.

S-a observat de asemenea că în cazul migrării catodice numărul fracţiunilor proteice separabile este mai mare în cazul laptelui provenind de la animale cu producţie ridicată decît de la acelea cu producţie mai scăzută aşa cum se remarcă din figura 7.

Nu se constată vreo modificare a poziţiei izozimelor la cele două categorii de animale, deşi intensitatea benzilor şi, deci, activitatea enzimatică pot fi micşorate în cazul animalelor cu o producţie mai mică de lapte.

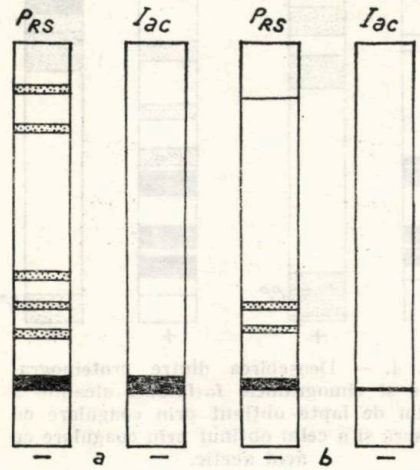


Fig. 7. — Proteinograma şi zimograma fosfatazei acide din serul de presură, în cazul electroforezei la pH 5,0. (*a*) cazul vacilor cu producţie mare de lapte şi (*b*) în cazul vacilor cu producţie mică.

DISCUȚII

Merită a fi accentuat că serul de presură conține în toate cazurile un număr mai mare de izozime, mai net delimitate, decît laptele integral. Deoarece presura exercită o acțiune proteazică, presupunem că sub acțiunea ei se produce o desfacere a complexelor formate între proteinele cu activitate enzimatică și proteinele specifice din lapte, în special diferitele tipuri de caseine. J. W. Copius Peereboom (12, 13), utilizînd unele date electroforetice, a făcut ipoteza că fosfataza alcalină este o enzimă polimerică, cea mai mică sub-unitate avînd o greutate moleculară de 18,000 daltoni. Această sub-unitate se poate asocia în complexe de 2, 4, 8, 16, 32 sub-unități, ultima avînd greutatea moleculară de 576 000 daltoni. Este deci posibil ca sub acțiunea presurei acești polimeri să se desfacă în urma acțiunii exercitate asupra legăturii dintre monomeri iar numărul izozimelor să crească, așa cum s-a observat atît în cazul fosfatazei, dar mai ales al peroxidazei. Proteinele enzimatice mai pot forma complexe și cu alte proteine specifice din lapte, ceea ce explică coincidența pe zimograme a activității enzimelor cercetate cu diferitele tipuri de cazeină, cu alfa-lactalbumina și cu beta-lactoglobulina. Complecșii dintre proteinele laptelui și enzimele specifice pot deveni inactivi în anumite condiții. Invers, anumiți factori pot desface acești complecși, enzima devenind din nou activă. În acest mod se poate explica fenomenul de „reactivare" a fosfatazei alcaline din laptele pasteurizat, care a suscitat numeroase cercetări de interes practic și științific (14—19). Presupunem că în cursul încălzirii se formează între fosfataza alcalină și cazeină complecși inactivi. Prin ședere sau sub acțiunea unor reactivi, acești complecși se desfac, ceea ce explică reactivarea. Recent am observat că însăși cazeina comercială inactivă enzimatic, în urma solvirii în uree, sau hidroxid de sodiu, dă zimograme cu regiuni fosfataz sau peroxidaz-active. Fracțiunea cea mai puternic activă coincide cu a betacazeinei, iar cea peroxidazică cu a beta-lactoglobulinei. Prezența acestor complecși se poate demonstra electroforetic chiar în cazul serului de presură. În adevăr, dacă aciditatea tamponului din cuva anodică scade de la pH 8,6 la valoarea pH 5,0, activitatea fosfatazică a izozimelor crește, iar delimitarea lor se accentuiază, așa cum se vede din figura 8.

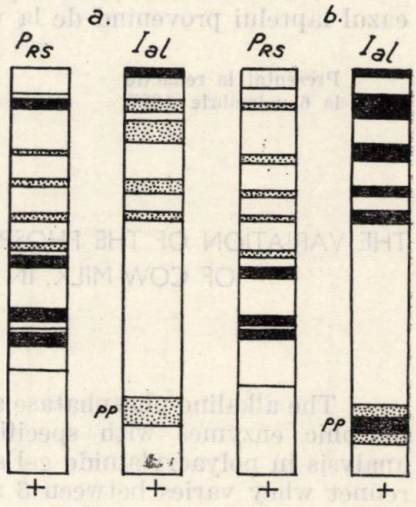


Fig. 8. — Proteinograma și zimograma fosfatazei alcaline din serul de presură; (*a*) în cazul cînd pH-ul în cuva anodică este 8,6—9,0 și (*b*) în cazul cînd pH-ul în cuva anodică este de 5,0.

Această particularitate ar putea fi explicată prin aceea că sporul concentrației în ioni de hidrogen din cuva anodică mărește gradientul electric al cîmpului, favorizînd desfacerea complexului proteină-fosfatază, și, deci, accentuarea activității enzimatice.

Diferitele constatări semnalate în cursul acestei lucrări subliniază caracterele specifice ale proteinelor din lapte şi, în special, al reacţiilor de tip proteină-proteină. Variaţia lor poate constitui un indicator preţios pentru precizarea unor însuşiri genetice cît şi a modificărilor de metabolism provocate de diverşi factori ca cei alimentari, de climat etc.

CONCLUZII

1. Zimograma fosfatazei alcaline şi aceea a peroxidazei din laptele de vacă au un aspect diferit de al acelora din serul obţinut prin coagulare cu ajutorul presurei.

2. Numărul izozimelor fosfatazei alcaline din serul de presură variază direct cu producţia de lapte a vacilor, iar al izozimelor peroxidazei, invers cu aceasta.

3. Fosfataza acidă este o enzimă formată dintr-o singură specie moleculară, cu un puternic caracter bazic, ceea ce o face să migreze rapid către catod în cîmpul electric.

4. Fracţiunea fosfatazei acide prezintă şi o intensă activitate peroxidazică. Este posibil, deci, ca aceeaşi proteină să aibă caracter bienzimatic, ceea ce ridică interesante întrebări asupra structurii centrului activ enzimatic şi al mecanismului său de acţiune.

5. Numărul fracţiunilor proteice cu caracter bazic este mai mare în cazul laptelui provenind de la vacile cu o mai mare productivitate.

Prezentat la redacţie
la 6 noiembrie 1977

Laboratorul de Biochimie, Facultatea de Medicină Veterinară, Spl. Independenţei No. 105, Bucureşti

THE VARIATION OF THE PHOSPHATASES AND PEROXIDASE ZYMOGRAMS OF COW MILK, IN FUNCTION OF THEIR YIELD

SUMMARY

The alkaline phosphatase and peroxidase of the cow's milk are polymorphic enzymes with specific isozyme patterns. The electrophoretic analysis in polyacrylamide gel shows that the number of isozymes in the rennet whey varies between 3 and 5. The number of isozymes in higher in the milk of cows with a greater yield than in that with a smaller one Inversely, the number of peroxidase isozymes of the rennet whey i higher (above 18 isozymes) in the milk of cows with low yield of milk and only 3—8 in that with a higher milk production. The acid phosphatase shows only a single fraction with a strong basic character, migrating towards the cathode during the electrophoresis at pH 5.0. This fraction shows also a strong peroxidase activity. There are discussed the possibilities of interreaction between the specific proteins of milk and the endogeneous enzymes which could explain different phenomena as the re-activation of alkaline phosphatase after heating (pasteurisation).

BIBLIOGRAFIE

1. Buruiană L. M., M. Lerch, Naturwiss. **54,** *4*, 92 (1967).
2. Buruiană L. M., M. Marin, Atti del III Simposio Internazionale di Zootecnia. p. 637—684, Milano (1968).
3. Buruiană L. M., M. Marin Le Lait No *481—482*, (1969).
4. Buruiană L. M., E. Hadarag, Enzymologia. **36,** *2*, 73 (1969).
5. Buruiană L. M., A. Dema, Rom. Biochem. Letters. p. 97 (1970).
6. Buruiană L. M., M. Suteanu, Luc. Ştiinţ. IANB. Ser. D,. **XV,** 89 (1969).
7. Buruiană L. M., A. Dema, Rev. roum. Biochim. **6,** *4*, 275 (1969).
8. Buruiană L. M., Le Lait. **XIII,** *130*, 1214 (1933).
9. Buruiană L. M., Naturwiss. **45,** *14*, 339 (1958).
10. Davies B. J., Ann. N. Y. Acad. Sci. **121,** 404 (1964).
11. Buruiană L. M., M. Petculescu, A. Dema, Rev. roum. Biochim. **14,** *3*, 149 (1977).
12. Copius Peereboom J. W., Neth Milk & Dairy J. **20,** 113 (1966).
13. Copius Peereboom J. W., Neth. Milk & Dairy J. **22,** 137 (1968).
14. Wright R. C., J. Tramer, J. Dairy Res. **20,** 177 (1953).
15. Siegenthaler E., Mitt. Gebiete Lebens. U. u. Forsch. **45,** 84 (1954).
16. McFarran E. F., R. C. Thomas, Black L. A., J. E. Campell, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. **43,** 414 (1960).
17. Richardson L. A., McFarran, J. E. Campell, J. Dairy Sci. **47,** 205 (1964).
18. Ngoc-Cu Do, L. Lenoir, R. Veisseyre, Le Lait. **45,** 177 (1953).
19. Copius Peereboom J. W., H. W. Beekes J., Chromatog. **39,** 339 (1969).

DETERMINAREA GAZ CROMATOGRAFICĂ A ACIZILOR BILIARI DIN BILĂ[1]

CIUPE ROMANO*), ILEANA FUNDUC**) DANIELA TĂPĂLAGĂ***)

Rezumat. Lucrarea prezintă o metodă simplificată de dozare a acizilor biliari din bilă, prin gaz cromatografie cu detector FID. Metoda foloseşte 1 ml bilă, care se dozează prin silanizare, ca BSTFA-metil ester. Sensibilitatea metodei corespunde unei cantităţi de 25 μg/μl acid litocolic. Coloana de separare, din sticlă, conţinea SE—30,8%, pe Chromosorb Wsil., de dimensiunea granulelor de 80—100 meşi.

Acizii biliari, conjugaţi cu taurina şi glicina sînt constituenţi ai bilei (5—10 g în 100 ml bilă hepatică), cu participare efectivă în generarea, întreţinerea sau reflectarea unor stări patologice ale ficatului. Atît capacitatea de conjugare cît şi valorile relative ale concentraţiilor celor 4 acizi biliari frecvent întîlniţi în bila umană (chenodeoxicolic, colic, deoxicolic, litocolic) sînt actualmente consideraţi ca teste ale alterării funcţiei hepatice. Formarea calculilor biliari este atribuită modificării proporţiei dintre trei constituenţi ai bilei, respectiv acizii biliari (cu activitate tensioactivă) (1), lipide biliare (lecitina) (2) şi colesterolul, prin precipitarea acestuia (3 — 7).

În prezent nu este complet elucidată relaţia de cauzalitate dintre alterarea funcţiei celulei hepatice şi modificările în concentraţia acizilor biliari din bilă şi ser. S-au evidenţiat creşteri evidente ale concentraţiilor acizilor biliari în ser şi scăderea concentraţiei în bilă (de la 358 mg/zi la 33 mg/zi) (8) (9) în ciroză. Însă ipoteza iniţierii şi menţinerea unei leziuni în celula hepatică prin modificări în structura bilei nu a obţinut rezultate concordante (10), în general aceste probleme rămîn insuficient argumentate (11).

Prin importanţa lor şi efectele ce le generează prin variaţii ale concentraţiei lor, acizii biliari par să constituie teste importante în diagnosticarea şi chiar prognosticarea unor afecţiuni hepatice.

Scopul lucrării prezente este realizarea unei metode de analiză cantitativă, obiectivă, reproductibilă şi pe cît posibil simplificată, a acizilor biliari din bilă, în scopul utilizării şi ulterioare în studiul unor afecţiuni hepatice.

Metoda utilizează experienţa acumulată pînă în prezent de laboratorul nostru, şi cea menţionată în special de lucrările lui Sjövall (12) (13), Nilson (14), Vlahcevic (8), Makino (15).

Tehnica gaz cromatografică (16) (17), (18—21), prin capacitatea de separare şi sensibilitate ridicată, s-a dovedit cea mai indicată şi s-a impus

[1] Asistenţă tehnică: Găvan Maria

în ultimul timp, în paralel cu cea spectrofotometrică (22), spectrofluorimetrică (23), cromatografie în strat subţire (24—26), pe hîrtie sau coloană (27—29), colorimetrică (28) (29), enzimatică (25) (26) în mare parte tehnici semicantitative.

METODA

S-au utilizat pentru experimentări 30 bile hepatice, post operatorii, persoane sănătoase şi cu hepatopatii cronice, din care s-a luat în lucru 2 ml.

1. Extracţia acizilor biliari

Bila (2 ml) s-a adăugat în picături unui volum de 25 ml etanol fierbinte. Se filtrează. În această fază se poate întrerupe analiza prin conservarea bilei în filtrat la 4°C cu mai multe săptămîni (30).

2. Hidroliza esterilor colesterolului

Filtratul (1) după adăugarea a 10 ml KOH 33%, rezultînd un pH de 11, controlat cu galben de alizarină, se menţine 1 oră la 75—80°C pe baie de apă în curent de azot.

3. Extracţia steroizilor neutrii

Se fac două extracţii succesive cu cîte 20 ml hexan în pîlnie separatoare. Hexanul se înlătură după o prealabilă spălare cu 10 ml de apă, care se adaugă la etanol. Soluţia alcoolică se înfiolează în fiole de 10 ml (excesul se evaporă).

4. Hidroliza acizilor biliari — decuplarea de taurină sau glicină.

Fiolele se autoclavează timp de 3 ore la 1,5 atm.

5. Soluţia se răceşte în gheaţă şi se adaugă metanol pentru a obţine o proporţie de 5 : 2 cu apa din extract.

Se acidulează cu H_2SO_4 50% (indicatorul roşu de Congo).

6. Înlăturarea acizilor graşi

Se fac două extracţii cu hexan în proporţie egală cu soluţia, ulterior cu apă, care se adaugă soluţiei iniţiale. Hexanul se înlătură.

7. Separarea acizilor biliari din soluţia apă-metanol prin agitare cu 5 volume de eter etilic liber de peroxizi. Eterul etilic se spală ulterior cu un volum de apă, care se înlătură.

Eterul conţinînd acizii biliari se evaporă în curent de azot. Înainte de evaporarea totală se transvazează în eprubete conice de 10— 15 ml unde se aduce la sec.

8. Metilarea

Se efectuează prin adăugarea în eprubetele cu probe a unei cantităţi de 1—3 ml soluţie eterică de diazometan pînă la persistenţa culorii galbene.

Prepararea soluţiei esterice de diazometan se realizează astfel : în balonul unei instalaţii de distilare cu refrigerent descendent de 200 ml se introduce 50 ml dintr-o soluţie de KOH 60%, 20 ml metil celoslov, iar printr-o pîlnie picurătoare se picură o soluţie 30% de N-nitroso-toluol-4-sulfometilamidă în eter etilic. Balonul se încălzeşte lent pe baie de apă la 40° — 45°C.

Colectarea soluţiei eterice de diazometan se efectuează într-un balon răcit în gheaţă. Soluţia va avea o culoare galbenă persistentă şi se poate păstra la întuneric, la rece şi închisă, cîteva săptămîni.

9. Silanizarea

Se evaporă la sec conţinutul eprubetelor, apoi se adaugă cîte 0,5 ml BSTFA după care se lasă în repaus 1 oră.

10. Determinarea gaz cromatografică

Parametrii gaz cromatografici :
Aparat : Carlo Erba GD—ACI
Coloana : din sticlă cu diametre de 6 × 4 mm şi lungime de 2 m.
Faza staţionară : SE — 30,8% pe Chromosorb W sil.
80 — 100 mesh
Temperatura detectorului : 280°C
" coloanei : 250°C
" vaporizorului : 300°C
Gaz purtător N_2 : 3 atm.
Gaze auxiliare H_2 : 0,5 atm.
aer : 1 atm.

Se injectează în aparat 3 µl din soluţia rezultată după silanizare, produsul final fiind solubil în reactiv.

Rezultate:

Determinările cantitative s-au efectuat prin metoda curbei etalon, trasată pentru fiecare component, luînd în considerare aria picurilor.

Acurateţea. Acurateţea metodei s-a determinat efectuîndu-se probe paralele asupra unui adaus în apă şi respectiv asupra unui adaus în bilă.

Tabelul 1

Cuprinzînd acurateţea metodei

Compusul	Cantitatea adăugată µg	Recuperarea din apă %		Recuperarea din probă %	
		Media	D.S.	Media	D.S.
Chenodeoxicolic	5	91	3,7	92	3,1
	25	95	2,2	95	2,3
Colic	5	93	3,3	95	3,0
	25	94	4,8	96	3,8
Litocolic	5	89	5,9	91	4,6
	25	92	4,5	93	4,0
Desoxicolic	5	90	3,6	91	3,2
	25	94	4,2	95	4,0

Precizia. Evaluarea preciziei s-a făcut utilizînd metoda lui Snedecor, efectuîndu-se analize a probelor duble, SD-ul mediilor a fost calculată după formula:

$SD = d^2/2N$ unde:

d = diferenţa dintre duplicate

N = nr. determinărilor duble

Rezultatul se redă în tabelul 2.

Tabelul 2

Precizia metodei estimată prin 8 determinări duble

Compusul	Limite g/ml	S.D.
Chenodeoxicolic	0,011—0,100	0,021
Colic	0,022—0,130	0,033
Litocolic	0,002—0,016	0,006
Deoxicolic	0,018—0,072	0,028

Sensibilitatea metodei nu s-a urmărit să se determine, fiind satisfăcător răspunsul detectorului la concentraţiile componentului minim, acidul litocolic corespunzînd la 25 µg/µl — injectaţi în aparat.

Specificitatea. Confirmările identităţii picurilor s-a efectuat prin utilizarea spectrometriei de masă (35) în special pentru acidul chenodeoxicolic a cărui identificare a fost mai dificilă în ansamblul unor compuşi neidentificaţi, care complică cromatograma.

Tabelul 3

Conţinutul în acizi biliari a probelor de bilă umană (g/2 ml bilă)
Valori medii obţinute din cîte 6 probe grupate pe afecţiuni specifice şi martor

	Chenodeoxicolic	Colic	Litocolic	Desoxicolic
Martor	0,085	0,05	0,006	0,031
Afecţiuni specifice	0,08	0,15	0,009	0,047

CONCLUZII

Alegerea unei coloane normale s-a făcut ţinînd cont de faptul că acizii biliari în bilă se găsesc în cantităţi relativ mari comparativ cu alţi compuşi. În plus aceşti compuşi au şi un rol major biochimic, ceilalţi compuşi minori sau produşi rezultaţi în procesul analizei nefiind necesar să fie relevaţi. Astfel cromatograma va avea un aspect mai simplificat, evaluarea cantitativă fiind mai uşoară.

Geneza unor componenţi neidentificaţi se explică atît prin izomerizarea compuşilor majori în cursul procesului de izolare cît şi prin încălzirea în prezenţa etanolului (31) (32).

Versatilitatea metodei este practic limitată de numărul probelor ce se pot determina la gaz cromatograf. Ştiind că o probă necesită un timp de 25 minute, se consideră că se pot efectua practic 15 probe pe zi.

Prezentat la redacţie
la 22 aprilie 1978

*) *Institutul de Igienă şi Sănătate Publică 3400 — Cluj-Napoca,*
**) *Spitalul clinic, Clinica de hematologie Fundeni — Bucureşti*
***) *Clinica Medicală III — Cluj-Napoca*

DIE GAS-CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON GALLENSÄUREN AUS DER GALLE

SUMMARY

Die Arbeit umfasst eine vereinfachte Bestimmungsmethode von Gallensäuren aus der Galle mit Hilfe der Gas-Chromatographie mit FID— — Detektor. Es werden 2 ml Galle, welche als silanisierte, durch BSTFA—Methylester bestimmt wurde, benötigt. Die Empfindlichkeit der Methode entspricht einer Menge von 25 μg/μl Lithocholsäure. Die Trennsäule, welche aus Glas bestand, entheilt SE—30,8% auf Chromosorb W sil. von 80—100 mesh. Korngrösse.

BIBLIOGRAFIE

1. *** *Chromatography of Lipids*, Supelco Inc. VI, 4 p. 1 (1972).
2. Neniţescu, C. D., *Tratat elementar de chimie organică*, vol. **1**, Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 673. (1976).
3. Small D. M., Bourges, M., Dervichian, D. C., Nature **211**, 816 (1966).
4. Small, D. M., Bourges, M., Dervichian, D. G., Biochim. Biophys. Acta **125**, 563 (1966).
5. Scherstent, Nilson, S., Cahlin, V., Scand. of Gastroent., **5**, 473—478 (1970).
6. F. Kaheyama and colab., Clin. Chim. Acta, **10**, 544 (1964).
7. Schoenfield, L. J., Sjövall, Y., J. Lab. Clin. Med. **68**, 186, (1966).
8. Vlahcevic, Z., Buhac I.; Farrar, J., Bell, J., Swell, L., Gastroenterology, **60**, 491 (1971).
9. Makino, J., Shoichi, N., Keimei, M., Gastroenterology, **56**, 1033 (1969).
10. Tăpălagă D., Ciupe, R., *Metabolismul sărurilor biliare în hepatopatiile cronice* — (1974) — nepublicat, IMF — IISP, Cluj-Napoca.
11. Schersten, T., *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, vol. **2** (1970), Academic Press, Inc., New York and London.
12. Sjövall, J., Acta Chem. Scand., **8**, 339 (1954).
13. Sjövall, J., Acta Chem. Scand., **16**, 1761 (1962).
14. Nilsson, A., Borgstram B., Biochim. Biophys. Acta, **137**, 240 (1967).

15. Makino, I., Sjövall, J., Anal. Leters, **5**, 341–349 (1972).
16. Blomstrand, R., Proc. Joc. Exp. Biol. Med., **107**, 126 (1961).
17. Messini, M., Ricci, G., Crespi, M.; Bani, U., Press Med., **74**, 13, 670 (1966).
18. Klaasen, C. D., Clin. Chim. Acta., **35**, 225–229 (1971).
19. Roovers, J., Evrard, E. Vanderhaeghe, H., Clin. Chim. Acta, **19**, 449–457 (1968).
20. Evrard, E., Janssen, G., J. Lipid. Res., **9**, 226–236 (1968).
21. Matern, S., Sjövall, J., Pomare, E. W., Heaton, K. W., Low–Beer, T. S., Med., Biology, **53**, 107–113 (1975).
22. Lambiotte, M., Rev. Intern. Hepatol: **7**, 521 (1957).
23. Feher, T., Papp, J., Kazik M. H., Z. Klin. Chem., Klin. Biochem. **11**, p. 376–380 (1973).
24. Jones, D. D., Clin. Chim. Acta, **19**, 57–62 (1968).
25. Turnberg, L. A., Anthony – Mote, A., Clin. Chim. Acta, **24**, 253–259 (1969).
26. Bruusgaard A., Clin. Chim. Acta, **28**, 459–504 (1970).
27. Sjövall, J., Clin. Chim. Acta, **4**, 652–664 (1959).
28. Wootton, I. D. P., Osborn, E. C., Mem. Soc. Endocrinol, **8**, 70–76 (1960).
29. Bongiovanni, A. M., J. Clin. Endocrinol. Metab., **25**, 678–685 (1965).
30. Dean, D.D.G., Whittemousse, M. W., Biochem. J. **99**, 1 (1966).
31. Eneroth, P. Gordon, B., Ryhage, R., Sjövall, J., J. of Lipid Res., **7**, 511–523 (1966).
32. Harris, S. W.; Marai, L., Myher, J.J., Subbiahr, R. M. T., J. of Chromatog., **131**, 437–41, (1977).

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A GRĂSIMII DE DEPOZIT LA VERTEBRATE ; SEMNIFICAŢIE BIOLOGICĂ ŞI TERAPEUTICĂ

SIMONA CEAUŞESCU, LUIZA SCHIOIU, N. STĂNCIOIU, ANI POBORAN, FL. CUCU

Rezumat. Prin cromatografie în fază gazoasă se determină compoziţia în acizi graşi a grăsimii de depozit recoltată de la peşti *(Trachurus trachurus mediteraneus)*, reptile *(Testudo graeca ibera)*, păsări *(Gallus domesticus)* şi mamifere *(Bos taurus, Sus scrofa ferus, Homo sapiens)*. Rezultatele obţinute arată că proporţia acizilor graşi nesaturaţi scade pe scara evolutivă a animalelor vertebrate cercetate şi creşte cea a acizilor saturaţi. Această modificare reflectă evoluţia filogenetică a proceselor de sinteză lipidică. Stavridul *(Trachurus trachurus mediteraneus)*, datorită grăsimii sale bogate în acizi graşi polinesaturaţi poate fi folosit ca dietă-tratament în corectarea hipercolesterolemiilor la om.

Cercetările privind compoziţia chimică a grăsimilor de depozit, în special a acizilor graşi din acestea, prezintă importanţă atît teoretic-fundamentală, prin scoaterea în evidenţă a evoluţiei metabolismului lipidic în scara vertebratelor, cît şi practică prin utilizarea, în special terapeutică, a acestor grăsimi. Este cunoscut atît rolul hipocolesterolemiant al grăsimilor nesaturate, cît şi cel hipercolesterolemiant al grăsimilor saturate (hipercolesterolemiile reprezentînd un important factor de risc în ateroscleroză) (1,2).

Pe baza datelor obţinute prin cercetări moderne despre natura componentelor raţiilor alimentare, s-a putut trece la primele încercări de transformare „în vivo" a grăsimilor saturate în grăsimi nesaturate. Lucrările lui Nestel (3) stau mărturie în această direcţie.

În lucrarea de faţă s-a determinat compoziţia chimică a grăsimii de depozit la animale în scara vertebratelor, plecînd de la necesitatea cunoaşterii acestei compoziţii în scop preventiv şi terapeutic pentru sănătatea omului, cît şi pentru a arăta semnificaţia ei biologică în eventualitatea sunei evoluţii filogenetice a sintezei lipidelor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Grăsimea de porc, vacă şi pasăre, a fost recoltată imediat după sacrificarea animalelor la abator. S-a folosit grăsime de peşte congelat, care se găseşte pe piaţă, iar grăsimea de broască ţestoasă s-a recoltat imediat după sacrificare prin decapitare. Grăsimea umană a fost recoltată de la bolnavii care urmau să fie operaţi pentru ulcer gastric, înainte de a li se face rahianestezie, dar s-a folosit anestezia locală cu novocaină.

Acizii graşi din grăsimea recoltată au fost determinaţi după o metodă aplicată curent la Institutul de Cercetări Alimentare Bucureşti (4). Aceasta constă din două etape principale: 1) Prepararea esterilor metilici ai acizilor graşi din grăsimea de analizat şi 2) Cromatografierea în fază gazoasă a esterilor metilici cu ajutorul aparatului Perkin-Elmer (Anglia). Prepararea esterilor metilici s-a făcut astfel: proba de grăsime de 4g, la care s-a adăugat 40 ml alcool metilic

și 0,5 ml KOH N soluție metanolică, se fierbe sub agitare și reflux pînă cînd soluția devine limpede. Se trece conținutul într-o pîlnie de separare unde se mai adaugă 20 ml cloroform și 40 ml apă distilată și se agită. Se separă apoi faza cloroformică în care avem solubilizați esterii metilici. Se spală cu apă distilată, se decantează, se tratează cu sulfat de sodiu anhidru, se filtrează și se evaporă sub curent de azot. O probă de 0,01µl s-a cromatografiat în fază gazoasă, obținîndu-se curbele acizilor grași din grăsimea de analizat. Identificarea acizilor grași s-a făcut cu ajutorul curbelor etalon. S-a măsurat suprafața fiecărui pic, s-au însumat valorile obținute și apoi s-a calculat proporția fiecăruia față de total, rezultatul exprimîndu-se în procente %.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza datelor experimentale obținute, se constată o diferență de compoziție în acizi grași a grăsimii de depozit între clasele cercetate, dar mai ales între pești și celelalte clase din vertebrate. În grăsimea de pește *(Trachurus trachurus mediteraneus)* a fost determinată o cantitate mare de acizi grași polinesaturați și nesaturați cu lungimea catenei de peste 18 atomi de carbon și cu un grad mare de nesaturare (pînă la 6 duble legături) (fig. 1). Datele noastre sînt asemănătoare cu cele obținute și de alți cercetători, care au făcut asemenea determinări pe grăsimea de la alte specii de pești (5, 6, 7). Proporția mare de acizi grași nesaturați în grăsimea de pește pare să fie în legătură cu imposibilitatea organismului de a sintetiza acizi grași din proteine și hidrați de carbon și din această cauză absoarbe grăsimile așa cum le găsește în hrană (plancton) și le depune în corp ca atare fără modificări esențiale (8).

Fig. 1. — Cromatograma grăsimii de pește *(Trachurus trachurus mediteraneus)*

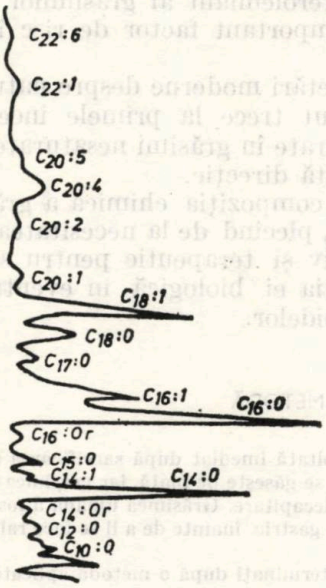
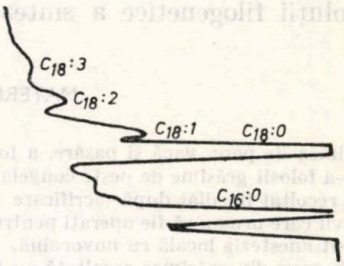


Fig. 2. — Cromatograma grăsimii de reptilă *(Testudo graeca ibera)*



O notă aparte prezintă grăsimea de broască țestoasă al cărei conținut de acid seaaric (C_{18} : 0), arată un grad de saturare extrem de ridicat și complet opus grăsimii de pește (fig. 2). Pe de altă parte prezintă o proporție relativ scăzută de C_{18} : 3, pe care nu o regăsim la homeoterme. Rezul-

tatele mai arată, că broasca țestoasă se apropie de homeoterme prin proporția de acid linoleic și acid stearic. Dacă ne referim la acidul palmitic, datele din tabela 1 ne arată o proporție aproximativ egală la toate speciile cercetate. Legătura pe care o fac amfibienii între pești, pe de o parte și celelalte clase, pe de altă parte, din punct de vedere al proporției de acizi grași saturați și nesaturați din grăsimea de depozit, ne dă posibilitatea să afirmăm, că odată cu trecerea la viața terestră, moment înregistrat de amfibieni, asistăm la apariția capacității de sinteză a acizilor grași saturați, paralel cu depozitarea celor nesaturați, luați direct din hrană. La *Testudo graeca ibera*, specie studiată de noi, proporția acizilor grași nesaturați era de 37%, iar a celor saturați de 63%, în ciuda faptului că animalul se hrănește cu vegetale (tabela 2).

Tabela 1

Conținutul în acizi grași ai grăsimii de depozit la vertebrate (%)

Lungimea catenei și gradul de nesaturare	Tipul de grăsime					
	Pește	Reptile	Păsări	Mamifere		
				Vacă	Porc	Umană
	T.t. mediteraneus	Test : graeca	Gallus domest.	Bos taurus	Sus scrofa ferus	Homo sapiens
1	2	3	4	5	6	7
$C_{10}:0$	1	—	—	0,14	0,15	—
$C_{12}:0$			urme			1,60
$C_{14}:0$	9,23	—	1,06	3,20	1,98	3,50
$C_{14}:0$	urme	—	—	1,60	urme	1,10
$C_{15}:0$	0,78		urme			
$C_{16}:0$	0,15	—	—	0,26	—	0,20
$C_{16}:0$	23,24	21,20	24,43	25,12	28,32	21,40
$C_{16}:1$	7,42	—	5,23	2,70	3,66	4,80
$C_{17}:0r$	—	—	—	1,40	0,22	—
$C_{17}:0$	0,62	—	urme	0,49	0,40	0,30
$C_{18}:0$	6,28	41,58	7,92	29,41	14,54	7,70
$C_{18}:1$	19,96	13,65	45,00	32,46	39,28	38,50
$C_{18}:2$	—	19,27	16,36	3,28	11,47	18,90
$C_{18}:3$	—	4,30	—	urme	—	2,00
$C_{20}:1$	2,19	—	—	—	—	—
$C_{20}:2$	urme	—	—	—	—	—
$C_{20}:4$	9,47	—	—	—	—	—
$C_{20}:5$	2,84	—	—	—	—	—
$C_{22}:1$	13,96	—	—	—	—	—
$C_{22}:6$	3,78	—	—	—	—	—

Tabela 2

Proporția acizilor grași saturați, nesaturați și polinesaturați în grăsimea de depozit la vertebrate (la % din total grăsime)

1	2	3	4	5	6	7
Ac. saturați	40,38	62,90	33,41	61,56	45,59	35,80
Ac. nesaturați	59,62	37,10	66,59	38,44	54,41	64,20
Ac. polinesaturați	16,09	23,57	16,36	3,20	11,47	20,90

Mergînd mai departe pe scara vertebratelor observăm, că la păsări proporția de acizi grași nesaturați se menține ridicată, dar experiențele altor cercetători arată, că cei saturați provin din convertirea hidraților de carbon, proces ce are loc în ficat (fig. 3) (9).

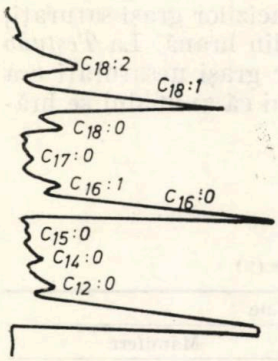


Fig. 3. — Cromatograma grăsimii de pasăre *(Gallus domesticus)*.

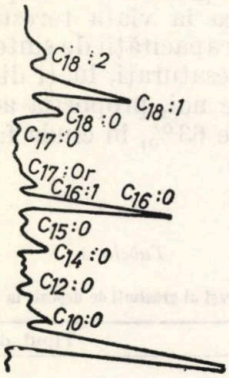


Fig. 4. — Cromatograma grăsimii de mamifer *(Bos taurus)*.

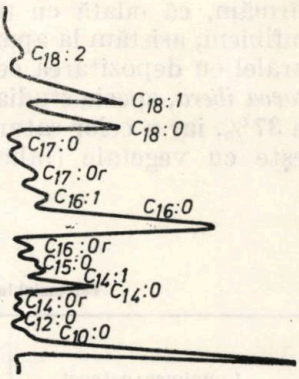


Fig. 5. — Cromatograma grăsimii de mamifer *(Sus scrofa ferus)*.

Comparînd datele obținute pentru cele 3 specii din clasa mamiferelor constatăm proporția mare a acidului C_{18} : O în grăsimea de vacă și relativ mică în grăsimea de om (fig. 4, 6). Se mai poate constata că gradul de saturare al acizilor grași este foarte apropiat la grăsimea de porc și om (fig. 5, 6). Se constată, de asemenea, că grăsimea de vacă are o concentrație mai mare de acizi grași saturați (61,56%) în raport cu cea de porc (45,49%), deși vaca se hrănește exclusiv cu vegetale, iar porcul fiind un omnivor. Aceasta ne dovedește prezența unor mecanisme de sinteză lipidică mai complicate la specia bovină. Într-adevăr, o serie de cercetări recente au arătat că locul de saturare al acizilor grași la bovine este rumenul, unde sub acțiunea microorganismelor se produce hidrogenarea acizilor nesaturați, iar compușii rezultați din degradarea celulozei servesc la sinteza acizilor grași saturați (10, 11, 12, 13). Bazați pe aceste cunoștințe despre digestia la rumegătoare, cercetătorii caută să obțină de la această specie o cantitate cît mai mare de acizi grași nesaturați, ca fiind necesari în provenirea și combaterea aterosclerozei la om (5).

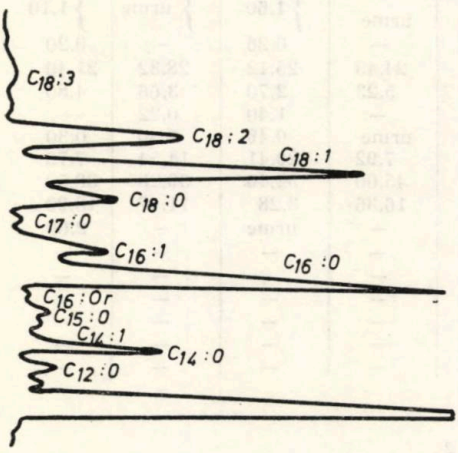


Fig. 6. — Cromatograma grăsimii de om *(Homo sapiens*

CONCLUZII

1. La vertebrate, compoziţia în acizi graşi a grăsimii de depozit reflectă evoluţia metabolismului lipidic, de la acizi graşi polinesaturaţi (peşti) spre cei nesaturaţi şi saturaţi (reptile, păsări, mamifere). Din acest punct de vedere, reptilele ar putea constitui poziţia intermediară între poichiloterme şi homeoterme.

2. La peşti, acizii graşi polinesaturaţi şi nesaturaţi din hrană se depun ca atare în corp, fără transformări esenţiale, în timp ce la celelalte clase de vertebrate, aceştia pot fi transformaţi în ac. graşi saturaţi.

3. Studiul nostru scoate în evidenţă specia de peşti *Trachurus trachurus mediteraneus*, care datorită grăsimii sale bogate în acizi graşi nesaturaţi poate fi folosită ca dietă-tratament în prevenirea aterosclerozei la om.

THE CHEMICAL COMPOSITION OF DEPOSITED FAT IN VERTEBRATES; ITS BIOLOGICAL AND THERAPEUTIC SIGNIFICANCE

SUMMARY

By chromatography in gaseous phase the composition in fat acids of deposited fat taken from fish (Trachurus trachurus mediteraneus), reptiles (Testudo graeca ibera), poultry (Gallus domesticus) and mammals (Bos taurus, Sus scrofa ferus, Homo sapiens) is determined. The results obtained show that the proportion of polyunsaturated and unsaturated fat acids decreases in animal fat in the scale of vertebrates, reflecting the phylogenetic evolution of fat synthesis processes.

The fish Trachurus trachurus mediteraneus (mackerel) owing to its fat rich in polyunsaturated fat acids can be used as a treatement-diet for correcting hypercholesterol in blood.

Prezentat la redacţie
la 15 martie 1978

Facultatea de Biologie, Bucureşti
Disciplina de Biochimie;
Facultatea de Med. Vet., Bucureşti
Disciplina de Fiziologie animală;
Institutul de Cercetări Alimentare
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Huang W. Y., Fred. A. Kumerov, Lipids, **11**, 1, 34—41 (1976).
2. Mulder I., Metz S. H. M., Zbl. Vet. Med. A., **18**, 293—296 (1971).
3. Nestel P., Havenstein N., Scott T. W., Cook L. J., Aus. N. Z. J. Med., **4**, 497—501 (1974).
4. ***, *Culegere de Standarde pentru Industria Alimentară*, Biblioteca Standardizării, Seria tehnică A, Colecţia STAS, 630.
5. Ilie C., Poboran A., Edelescu R., Crăescu I., Rev. Roum. Med., Int., **1**, 5, 451—462 (1964).
6. Stansby M. E., J. Amer. Diet. Ass., **63**, 6, 625 (1973).
7. Owen J. M., Adron J. W., Middleton V. C., Cowey C. B., Lipids, **10**, p. 9 (1975).
8. Cowey C. B., Adron J. W., Owen J. M., Roberts R. J., Comp. Biochem. Physiol. **53B**, p. 399 (1976).
9. Butler E. J., Proc. Nutr. Soc., **4**, p. 29 (1975).
10. Bryand M. P., Amer. J. Clin. Nutr., **23**, 11, 1440—1450 (1970).
11. Eyssen H., Armentier G. T., Amer. J. Clin. Nutr., **27**, 1329—1340 (1974).
12. Sachman D. I., Davis C. L., Bact., **48**, 1, 300—301 (1969).
13. Mills S. C., Scott T. W., Russel G. R., Smith R. M., Austr. Biol. Sci., **23**, 5, 1109 (1970).

CONCLUZII

1. La vertebrate, compoziția în acizi grași a grăsimii de depozit reflectă evoluția metabolismului lipidic, de la acizi grași polinesaturați (pești) spre cei nesaturați și saturați (reptile, păsări, mamifere). Din acest punct de vedere, reptilele ar putea constitui poziția intermediară între poikilotherme și homeotherme.

2. La pești, acizii grași polinesaturați și nesaturați din brumă se depun ca atare în corp, fără transformări esențiale, în timp ce la celelalte clase de vertebrate, aceștia pot fi transformați în ac. grași saturați.

3. Studiul nostru scoate în evidență aspecte de profil ??vechiului metabolism, care datorită grăsimii sale bogate în acizi grași nesaturați poate fi folosită ca dietă-tratament în prevenirea ateroscleorzei la om.

THE CHEMICAL COMPOSITION OF DEPOSITED FAT IN VERTEBRATES; ITS BIOLOGICAL AND THERAPEUTIC SIGNIFICANCE

SUMMARY

By chromatography in gaseous phase the composition in fat acids of deposited fat taken from fish (Trachurus trachurus mediterraneus), reptiles (Testudo graeca ibera), poultry (Gallus domesticus) and mammals (Bos taurus, Sus scrofa ferus, Homo sapiens) is determined. The results obtained show that the proportion of polynsaturated and unsaturated fat acids decreases in animal fat in the scale of vertebrates, reflecting the phylogenetic evolution of fat synthesis processes.

The fish Trachurus trachurus mediterraneus (mackerel) owing to its fat rich in polynsaturated fat acids can be used as a treatment-diet for correcting hypercholesterol in blood.

Prezentat la redacție
la 15 martie 1978

Specialiștii de Biologie, Bucureșt
Disctipline de Biochimie:
Facultatea de Med. Vet., Bucureșt
Disciplina de Fiziologie animală:
Institutul de Cercetări Alimentare
Bucureșt

BIBLIOGRAFIE

1. Hraze W. Y., Prom. A. Komarov, Lipids, 11, 1, 84—91 (1976).
2. Merlan I., Metz S. H., M., Zbl. Vet. Med. A., 18, 253—259 (1971).
3. Nestel P., Havenstein N., Scott T. W., Coon L., J. Nutr., 4, 187—201 (1974).
4. ***, Culegere de Standarde pentru Industria Alimentară, Biblioteca Standardizării, Seria tehnică A, Colecția STAS, 630.
5. Ilie C., Popescu A., Ispirescu R., Craiescu I., Rev. Roum. Med., Int., t. 3, 131—135 (1965).
6. Stansby M., E., J. Amer. Diet. Ass., 68, 6, 525 (1976).
7. Owen J. M., Adkins J. W., Slingerlens V. C., Cowey C. B., Lipids, 10, p. 9 (1975).
8. Cowey C. B., Adkins J. W., Owen J. M., Roberts R., J. Comp. Biochem. Physiol. 53B, p. 359 (1976).
9. Burton E. J., Proc. Nutr. Soc., 4, p. 29 (1976).
10. Beynen M. P., Amer. J. Clin. Nutr., 33, 11, 1140—1150 (1970).
11. Kessen H., Abrahamsen G. T., Amer. J. Clin. Nutr., 27, 1329—1340 (1974).
12. Scow R. O., L. Davis C. I., Brit. J., 48, 1, 300—301 (1969).
13. Mills S. C., Scott T. W., Rossen G. R., Smith R. M., Amer. Biol. Sci., 23, 5, 1199 (1970).

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A GLICOPROTEINELOR. VI. TRIPSINOLIZA IMUNOGLOBULINEI A SECRETOARE (SIgA) TRATATĂ CU GLICOZIDAZE DIN *DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE*

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. SIgA şi SIgA redusă şi alchilată, izolate din colostru uman au fost tratate cu glicozidaze din Diplococcus pneumoniae. S-a determinat cantitatea de glucide eliberate. Probele menţionate cît şi probe similare netratate cu glicozidaze au fost supuse digestiei cu tripsină. Modificările produse de hidroliza enzimatică au fost evidenţiate prin dubla difuzie radială, imunoelectroforeză, imunoelectroforeză încrucişată şi disc electroforeză în gel de poliacrilamidă. Rezultatele sugerează că îndepărtarea parţială a glucidelor din moleculele de SIgA sau SIgA redus le face mai susceptibile la proteoliză atît la nivelul SC cît şi la dimerul IgA.

Este bine cunoscută rezistenţa SIgA la atacul enzimelor proteolitice (1) (2). Prezenţa sa în diferite secreţii o pune în contact cu o serie de factori denaturanţi care ar împiedica exercitarea funcţiei de apărare locală a organismului. Majoritatea lucrărilor cunoscute explică această rezistenţă pe baza structurii speciale a acestei imunoglobuline, prezenţa SC stabilizînd dimerul prin legături covalente şi necovalente.

Conţinutul ridicat în glucide a SIgA (8,7—10,25%) (3), SC însuşi fiind o glicoproteină(11,25—12,34% glucide) (4) ar putea de asemenea contribui la rezistenţa la proteoliză a SIgA.

Într-o lucrare anterioară (5) s-a arătat că îndepărtarea acidului neuraminic din SIgA colostral produce modificări ale hidrolizei SIgA cu enzime proteolitice numai la nivelul SC, dimerul nefiind afectat.

Acidul neuraminic este un rest final în lanţurile oligozaharidice ale glicoproteinelor. După îndepărtarea sa, SIgA posedă încă un conţinut glucidic suficient de mare pentru a-i conferi rezistenţa la proteoliză.

Ca urmare în lucrarea de faţă s-a urmărit comportarea SIgA la atacul enzimelor proteolitice după îndepărtarea unei proporţii mai mari de glucide de către preparatul de glicozidaze izolat din Diplococcus pneumoniae.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea SIgA. SIgA a fost preparat după metoda descrisă de Mestecky şi col. (6) din colostru uman degresat şi decazeinizat. Produsul obţinut este purificat dînd în final o singură linie de precipitare cu antiserul anti-colostru uman.

Reducerea SIgA s-a realizat în tampon TRIS-HCl 0,5M pH 8,2 cu 2-mercaptoetanol în concentraţii finale de 0,1M 0,2M şi 0,4M, 1 h la temperatura camerei. Alchilarea s-a făcut prin adăugarea unui volum egal de iodacetamină rece, 1 h pe gheaţă.

St. cerc. biochim., 21, 2, 163—168 (1978)

Digestia cu glicozidaze. Glicozidazele din Diplococcus pneumoniae au fost preparate după metoda Koide şi Muramatsu (7). Incubarea SIgA şi SIgA redus şi alchilat s-a efectuat în tampon TRIS-HCl 0,1M pH 7,5 6 zile la 37°. Raportul E/S = 1/6. Acţiunea glicozidazei s-a apreciat prin determinarea glucidelor eliberate după metoda Dubois (6).

Digestia cu tripsină a SIgA. Proba martor conţinînd SIgA şi SIgA redus şi alchilat cît şi probe pretratate cu glicozidaze au fost hidrolizate cu tripsină. Hidroliza s-a realizat în tampon TRIS-HCl 0,1M pH 8 conţinînd $CaCl_2$ 0,02M, 18 h la 37°C. Raportul E/S = 1/50.

Dubla difuzie radială s-a practicat după Ouchterlony (8) în agaroză 1% folosind antiseruri anti-SIgA şi anti-SC.

Imunoelectroforeza s-a realizat în tampon veronal-veronal sodic pH 8,6 200V, 1 mA/cm.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a realizat după Davis (9).

Imunoelectroforeza încrucişată s-a realizat în aceleaşi condiţii ca şi imunoelectroforeza unidimensională. Timpul de migrare a fost de 3 ore pentru fiecare direcţie. Raportul antiser/gel a fost 1/20 (10).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Studiul importanţei părţii glucidice a moleculei de imunoglobulină capătă o răspîndire tot mai largă în ultimii ani. Miller, în 1972, a folosit o serie de exoglicozidaze pentru îndepărtarea resturilor glucidice din glicoproteinele obţinute prin digestia cu pronază a lanţurilor H ale IgG de iepure (11). Interesant este însă de urmărit comportarea moleculei de imunoglobulină intactă, după îndepărtarea unor componente ale lanţurilor glucidice. Williams şi col. (12) au găsit modificări ale unor proprietăţi biologice şi serologice ale IgG de iepure în urma eliberării unor resturi glucidice de către endoglicozidaza din D. pneumoniae. Aceşti autori cît şi alţii nu se referă însă şi la comportarea la acţiunea enzimelor proteolitice, ceea ce noi ne-am propus în această lucrare, ţinînd cont de cunoscuta rezistenţă a SIgA la atacul enzimelor proteolitice cît şi de conţinutul său mare în glucide.

Digestia cu gicozidaze a SIgA şi a SIgA redus şi alchilat. Preparatul de glicozidaze din D. pneumoniae s-a folosit în cea de a treia etapă de purificare a metodei Koide şi Muramatsu (7), cînd pe lîngă endo-β-N-acetilglucozaminidază se găsesc prezente şi exoglicozidaze. Aceasta deoarece endoglicozidazele hidrolizează substratul numai după îndepărtarea lanţurilor laterale ale componentelor glucidice de către exoglicozidaze.

Cantitatea de glucide eliberată de glicozidaze din SIgA a fost 35 μg/mg de SIgA. În cazul SIgA redusă, pentru concentraţiile de 2-mercaptoetanol folosite : 0,1M, 0,2M şi 0,4M s-au eliberat 58, 59 şi respectiv 65 μg glucide/mg SIgA. Se observă deci că în cazul SIgA redusă se eliberează o cantitate de glucide mai mare decît la SIgA probabil datorită unei mai mari accesibilităţi a enzimei sau a scindării glucidelor din SC eliberat parţial ; pe de altă parte, cea mai mare cantitate de glucide a fost eliberată din SIgA redus cu 0,4M 2-mercaptoetanol, concentraţie pe care am folosit-o în experienţele noastre. S-a lucrat pe cîte 4 probe atît pentru SIgA cît şi pentru SIgA redus şi alchilat :

1. SIgA
2. SIgA tratată cu tripsină
3. SIgA tratată cu glicozidaze
4. SIgA tratată cu glicozidaze şi tripsină.

Dubla difuzie radială a probelor amintite s-a urmărit atît faţă de antiserul anti-SIgA cît şi anti-SC.

Se observă (fig. 1) că SIgA tratat cu tripsină nu prezintă modificări față de molecula intactă, atît în raport cu antiserul anti-SIgA cît și cu anti-SC. Același lucru și în cazul SIgA redusă și alchilată intactă și tratată cu tripsină, cînd în ambele cazuri apar două linii de precipitare.

La SIgA tratată cu glicozidaze apare față de antiserul anti-SC o singură linie de precipitare; după tratarea cu tripsină a acestei probe, constatăm apariția unei a doua linii, datorate unui produs cu o viteză de difuzie mai mare. Această a doua linie se datorează probabil, unui fragment de SC eliberat de tripsină. În același sens sînt și rezultatele obținute cu anti-SIgA și anume, linia suplimentară prezentă la proba 5′, linie datorată SC legate, dispare după tratarea cu tripsină (proba 8′). Deci, hidroliza cu tripsină a SIgA tratată cu glicozidaze duce la dispariția liniei datorate SC legate, fenomen ce nu se întîlnește la probele netratate cu gicozidaze.

În ce privește SIgA redusă și alchilată, apariția unei a doua linii de precipitare în raport cu anti-SC, față de o singură linie la SIgA intact s-ar putea datora evidențierii în urma reducerii determinantului I, care la SIgA intact nu este accesibil (13). Apariția, în raport cu anti-SIgA a celei de a doua linii infirmă supoziția. În cazul antiserului anti—SC se observă dispariția liniei datorate compusului cu viteza de difuzie mai mică după hidroliza cu tripsină a SIgA redusă tratată cu glicozidaze, probabil SC liber, rămînînd numai linia de precipitare a compusului cu greutate moleculară mai mică, probabil un fragment de SC liber. Această linie este antigenic mai săracă decît cea a SIgA intactă tratată cu glicozidaze și tripsină.

Așadar, tripsina a acționat asupra SIgA redusă, la nivelul SC libere hidrolizînd-o într-un fragment ce-și păstrează încă dterminanții și care dă linie de identitate totală cu fragmentul de SC din proba netratată cu tripsină. Acest efect nu se întîlnește la SIgA redusă, netratată cu glicozidaze; îndepărtarea glucidelor de către glicozidaze ar avea deci ca rezultat creșterea susceptibilității SIgA la proteoliză, manifestată în modul arătat mai sus.

Imunoelectroforeza. Liniile de precipitare obținute față de antiserul anti-SIgA prezintă în cazul digestiei cu glicozidaze o deplasare catodică față de celelalte cazuri (fig. 2). În același timp, în urma digestiei cu tripsină a probelor pretratate cu glicozidaze, întîlnim și o migrare ceva mai rapidă spre anod. Este clar deci că tripsina care în mod normal nu produce modificări asupra aspectului electroforetic al SIgA, după îndepărtarea unor grupări glucidice ale glicoproteinelor de către endoglicozidaze, modifică ușor migrarea în cîmp electroforetic a moleculei SIgA. Dacă menținem presupunerea făcută anterior, că modificările produse de tripsină asupra SIgA sînt localizate la nivelul SC (5), aceasta concordă atît cu rezultatele noastre de față, cît și cu ale lui Brandtzaeg (14), care, arată că moleculele care pierd determinantul I, prezintă o mobilitate crescută.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă. La proba martor (fig. 3*a*) se observă benzile caracteristice SIgA. La proba tratată cu tripsină (fig. 3*b*) se constată dispariția benzii de pe start, cu reducerea intensității de colorare a celorlalte două. La proba tratată cu glicozidaze (fig. 3*c*) se observă în plus o migrare mai rapidă spre anod, fapt întîlnit și la experiențele de imunoelectroforeză. Atît tripsina cît și glicozidazele produc modi-

ficări în structura SIgA care se reflectă în comportări diferite la electroforeza în PAA atît faţă de martor cît şi între ele.

Acţiunea cumulată a celor două enzime conduce la o evidentă modificare a SIgA cu reducerea concomitentă a cantităţii (fig. 3*d*).

Imunoelectroforeza încrucişată. În figura 4 sînt date rezultatele cu serul imun anti-SIgA.

Tratarea cu tripsină face să dispară linia cu viteza cea mai mare de migrare; linia dată de SIgA e mai anodică, ca şi cea de a treia linie; în plus, componentul corespunzător acesteia din urmă este modificat de tripsină şi în sensul că pătrunde în gelul cu serul imun. Glicozidazele modifică linia cu viteza cea mai mare precum şi forma liniei dată de SIgA (fig. 4*c*). Din figura 4*d* se constată că îndepărtarea unei părţi glucidice din molecula SIgA conduce la o altă comportare la acţiunea tripsinei.

Cu anti-SC (fig. 5) se obţin două curbe care se unesc la ambele capete şi care, după viteza de migrare, corespund liniilor cu viteze extreme de migrare de la proba similară cu serul anti-SIgA (fig. 4*a*) Deci linia anodică din figura 4*a* este dată de un determinant SC. Cea de a treia linie din figura 4*a* şi 5*a* e dată probabil de un agregat de SIgA. Apariţia a 2 linii paralele cu anti-SC este semnalată de Brandtzaeg (15).

Sub acţiunea tripsinei (fig. 5 *b*) viteza anodică de migrare creşte la fel ca şi înălţimea arcurilor, indicînd o modificare esenţială a SIgA, probabil o hidroliză parţială a SIgA (1) (2) şi a agregatului. Modificarea are loc cu preponderenţă la nivelul SC dar şi al SIgA dimer deoarece vitezele de migrare sînt modificate şi la anti-SIgA (Fig. 4*b*). Cele două curbe reprezintă probabil BSC (SC legată în SIgA) pe cînd curba cu migrare anodică, SC liber sau un fragment de SC (SCf) (16).

Interesantă e apariţia unei componente foarte anodice ce dă un clopot mic de reacţie şi care poate fi sau SCf, sau o impuritate.

Tratarea cu glicozidaze a SIgA (fig. 5*c*) nu modifică forma liniei de precipitare dar dă naştere clopotului anodic obţinut şi la tripsină cu o viteză mai mică şi mai înalt.

Acţiunea celor două tipuri de enzime conduce la o modificare asemănătoare celei date de tripsină.

Clopotul anodic a dispărut, în schimb, apare un clopot slab, cu o viteză mai mare de migrare în ambele direcţii.

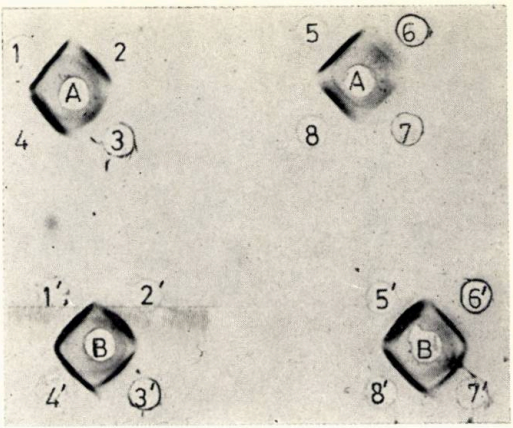
Componenta secretoare a SIgA suferă modificări în urma acţiunii tripsinei, dînd naştere unui fragment de SC — Kobayashi (16). Antiserul nostru sesizează atît fragmentul de SC cît şi modificări ale SC rămasă legată de IgA.

Faptul că glicozidazele au modificat componentul glucidic reiese din viteza de migrare mai redusă a probei (fig. 5*d*) comparativ cu fig. 5*b*.

Heremans a dat un model al structurii SIgA (17) care este confirmată de rezultatele noastre şi anume, răsucirea moleculei SC în jurul fragmentului Fc ale celor 2 molecule de IgA. Rezultatele noastre presupun prezenţa compusului glucidic pe suprafaţa SC.

Se poate spune deci că scindarea unei părţi glucidice face molecula de SIgA mai sensibilă la proteoliză atît la nivelul SC cît şi la cel al IgA dimere.

Fig. 1. — Dubla difuzie radială a SIgA și SIgA redus și alchilat. În godeurile centrale : *A*) — anti-SC ; *B*) — anti-SIgA În godeurile exterioare : *1*) SIgA ; *2*)SIgA redus și alchilat ; *3*) SIgA redus și alchilat + tripsină ; *4*) SIgA + tripsină ; *5*) SIgA + glicozidază ; *6*) SIgA redus și alchilat + glicozidază ; *7*) SIgA redus + glicozidază + tripsină ; *8*) SIgA + glicozidază + tripsină.



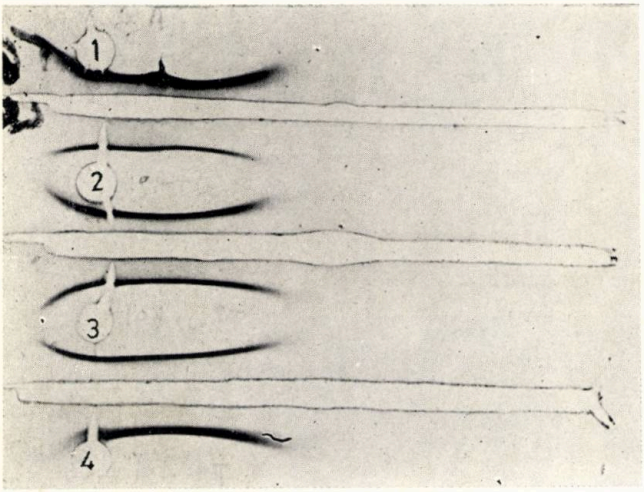


Fig. 2. — Imunoelectroforeza SIgA. În godeuri : *1*) SIgA ; *2*) SIgA + glicozidază ; *3*) SIgA + glicozidază + tripsină ; *4*)SIgA + tripsină. În șanțuri : anti-SIgA.

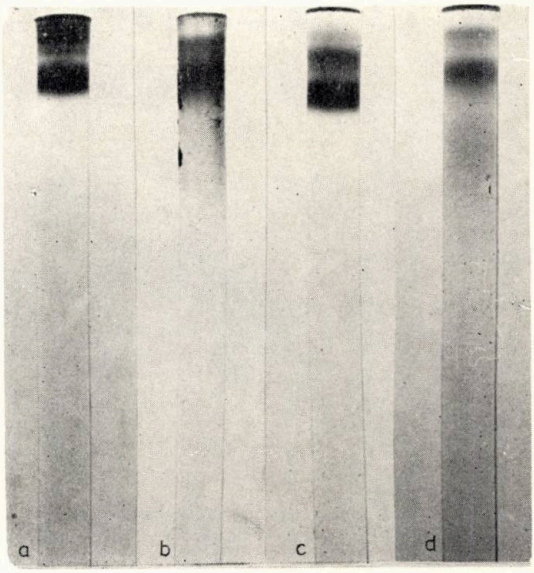


Fig. 3. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă : *a*) SIgA ; *b*) SIgA + + tripsină ; *c*) SIgA + glicozidază ; *d*) SIgA + glicozidază + tripsină.

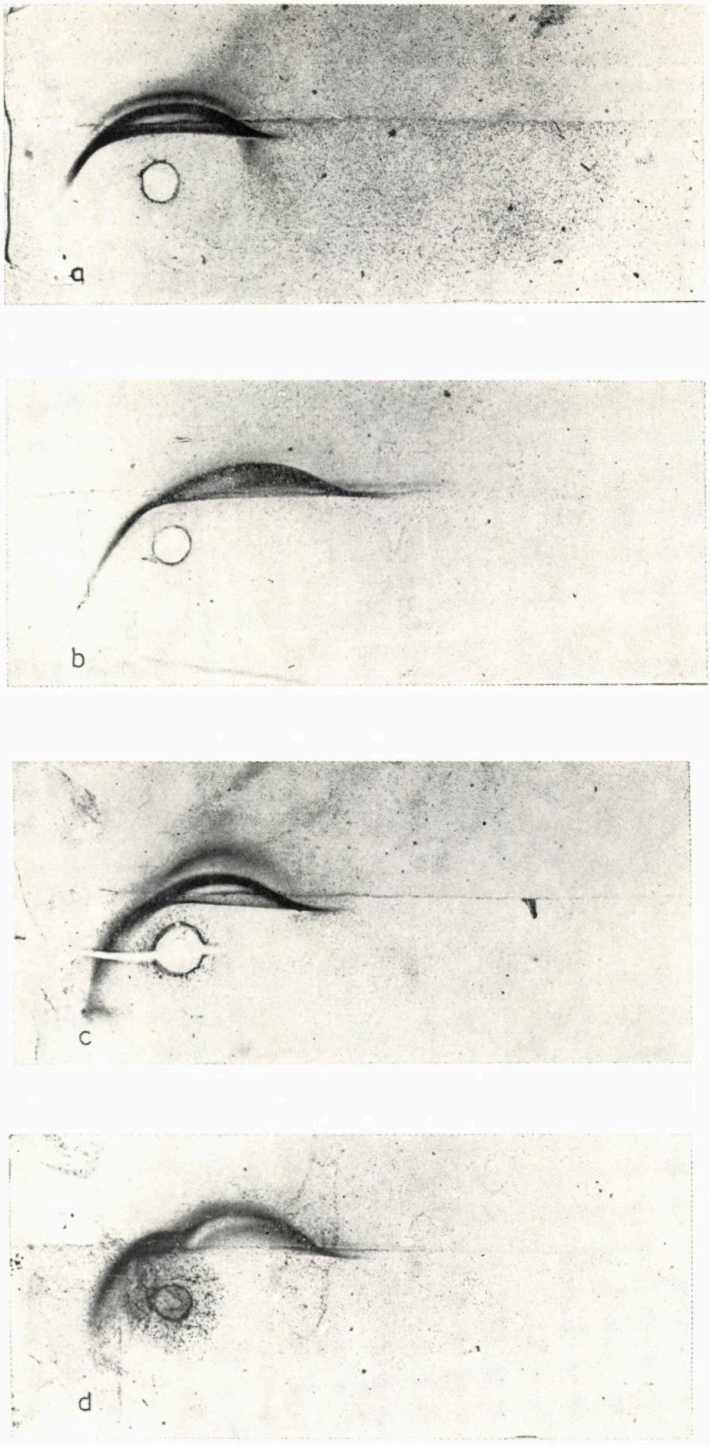


Fig.4. — Imunoelectroforeza încrucișată în anti-SIgA a : *a*) SIgA ; *b*) SIgA + tripsină ; *c*) SIgA + glicozidază ; *d*) SIgA + glicozidază + tripsină.

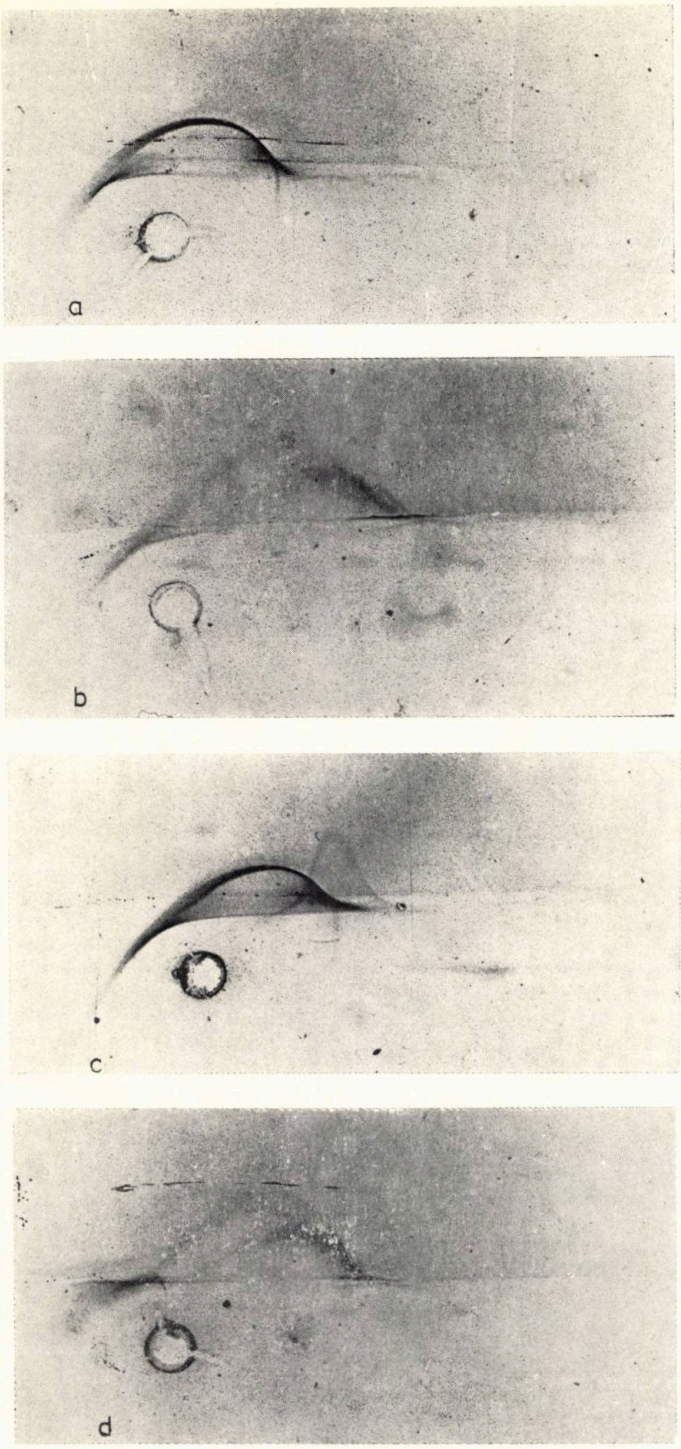


Fig. 5. — Imunoelectroforeza încrucișată în anti—SC a : *a*) SIgA ; *b*) SIgA + tripsină ; *c*) SIgA + glicozidază ; *d*) SIgA + glicozidază + tripsină.

Deci moleculele glucidice conferă SIgA o rezistenţă crescută la proteoliză.

Din rezultatele obţinute pe SIgA şi SC (18) se constată că comportarea la proteoliză a celor două forme de SC este dirijată de partea lor glucidică.

În formă liberă, cu toate glucidele prezente, este susceptibilă la proteoliză. Scindarea unei părţi glucidice o transformă într-o formă rezistentă la proteoliză.

În formă legată în moleculele de SIgA, cu toate glucidele prezente este rezistentă la proteoliză dar devine mai susceptibilă prin îndepărtarea parţială a glucidelor.

În concluzie, partea glucidică conferă rezistenţa la proteoliză SIgA.

Prezentat la redacţie:
la 6 martie 1978

Institutul de Ştiinţe Biologice
Departamentul de Biochimie
Colectivul de Proteine, Splaiul Independenţei 296 Bucureşti.

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. VI. TRYPSINOLYSIS OF SIgA TREATED WITH PNEUMOCOCCAL GLYCOSIDASES

SUMMARY

SIgA from human colostrum as well as reduced and alkylated SIgA were treated with glycosidases isolated from Diplococcus pneumoniae. The quantity of the removed carbohydrates was determined. The above mentioned samples, as well as similar ones, untreated with glycosidases were subjected to trypsin digestion. Changes occurring as a result of enzymatic hydrolysis were tested by radial immunodiffusion, immunoelectrophoresis, crossimmunoelectrophoresis and polyacrilamide disc electrophoresis. The results suggest that partial removal of carbohydrate moiety from SIgA or reducd SIgA molecules made them more susceptible to proteolysis both at the SC and IgA dimer level.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Cederblad, B. G. Johansson, L. Rymo, Acta Chem. Scand., **20**, 2349 (1966).
2. V. R. Brown, R. W. Newcomb, K. Ishizaka, J. Clin. Invest., **49**, 1374, (1970).
3. M. Tomana, J. Mestecky, W. Niedermeier, J. Immunol., **108**, 1631 (1972).
4. P. J. J. van Munster, C. B. A. Stoedinga, S. Poelszanders, Immunochem., **8**, 471 (1971).
5. E. Ganea, C. Motaş, Rev. Roum. Biochim., **12**, 29 (1975).
6. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. Kraus, J. Immunol., **108**, 758 (1972).
7. N. Koide, T. Muramatsu, J. Biol. Chem., **249**, 4897 (1974).
8. O. Ouchterlony, Acta Path. Microbiol. Scand., **206**, 507 (1949).
9. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).

10. O. Conrat, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., **124**, 39 (1972).
11. F. Miller, Immunochemistry, **9**, 217 (1972).
12. R. C. Williams, C. K. Osterland, S. M. Margherita, S. Tokuda, R. P. Messner, J. Immunol., **111**, 1690 (1973).
13. P. Brandtzaeg, I. Fjellanger, S. T. Gjeruldsen, Scand. J. Hemat. Suppl., **12**, 83 (1970).
14. P. Brandtzaeg, *Human secretory immunoglobulins* (3), p. 1., universitet forlage, 1970, Oslo, Norway.
15. P. Brandtzaeg, în *The immunoglobulin A system*, ed. J. Mestecky A. R, Lowton, Plenum Press, p. 87, (1974).
16. K. Kobayashi, J. P. Vaerman, J. F. Heremans, Immunochem., **10**, 731 (1973).
17. J. F. Heremans, în *The immunoglobulin A system*, ed. Mestecky A.R. Lowton, Plenum Press p. 3. (1974).
18. L. Buzilă, C. Motaş, Studii şi cercetări de biochimie (sub tipar).

INTERACŢIUNEA ANTICORPILOR CITOFILI DIN CLASA IgG CU RECEPTORII Fc AI LIMFOCITELOR

JABBAR-S-AHMED

Rezumat. IgG-ul citofil constituie o mică parte din IgG total reprezentînd maxim 1% în cazul IgG de iepure. Acesta are capacitatea de a se lega pe suprafaţa limfocitelor şi macrofagelor de şoarece prin intermediul receptorilor Fc. S-a studiat evoluţia nivelului IgG citofil în serul animalelor prin imunizare cu diferite antigene cu sau fără adjuvant Freund complet. Rezultatele obţinute sugerează că IgG citofil rezultă dintr-o populaţie policlonală de IgG care suferă tranziţii de conformaţie în regiunea lor Fc prin uzură metabolică şi că el reprezintă fracţiunea de IgG destinată catabolizării.

Receptorii Fc ai diverselor limfocite de mamifere au capacitatea de a fixa atît IgG monomer cît şi IgG din ser (1)(2) avînd o afinitate comparabilă în ambele cazuri. S-a constatat că IgG-ul citofil constituie o mică parte din IgG-ul global prezent în ser, variind de la 0,1—1% în cazul IgG de iepure (3) şi 2—3% în cazul IgG de om (4).

Boyden şi Sorkin (3) au demonstrat că prin imunizarea iepurilor cu albumină serică umană se poate realiza o creştere a nivelului de citofilie.

În scopul de a studia evoluţia nivelului IgG citofil în serul animalelor, am recurs la imunizarea iepurilor cu diferite antigene folosind diferite scheme de imunizare pentru a produce creşteri în citofilia IgG-ului.

Rezultatele obţinute de noi sugerează că IgG citofil nu este sintetizat de o categorie distinctă de plasmocite ci rezultă dintr-o populaţie policlonală care suferă tranziţii de conformaţie în regiunea lor Fc.

MATERIAL ŞI METODE

Limfocite. Suspensia celulară din splina de şoarece (AKR) s-a aplicat peste o soluţie de metrizoat de sodiu-Ficoll cu densitate 1, 077. S-a efectuat o centrifugare în gradient la 200 g, timp de 20 minute. Celulele s-au spălat de 3 ori cu mediu IC-65 (Institutul „I. Cantacuzino", Bucureşti). Viabilitatea s-a determinat prin metoda cu albastru de tripan. În majoritatea cazurilor viabilitatea celulelor a fost peste 95%.

Îmbrăcarea eritrocitelor de oaie cu proteina A din S. aureus (ES). Eritrocitele de oaie au fost îmbrăcate cu SpA după o tehnică descrisă anterior de Gheţie şi colab. (5). 0,25 ml eritrocite de oaie centrifugate s-au suspendat în 0,75 ml tampon veronal salin (pH 7,2) şi s-a adăugat 0,5 ml soluţie salină de SpA (2,5 mg). Peste amestec s-a adăugat treptat sub agitare magnetică 5 ml dintr-o soluţie de clorură cromică ($CrCl_3$) 0,5 mM. Amestecul final s-a incubat la 30°C pentru o oră într-un termostat Höppler şi apoi celulele s-au spălat cu tampon veronal salin de 3 ori prin centrifugare. Final, celulele s-au suspendat la o concentraţie de 10^9 eritrocite/ml în mediu IC-65 conţinînd azidă de sodiu 1 mg/ml. Eritrocitele îmbrăcate cu SpA (ES) au fost păstrate la 4°C şi utilizate în experimente timp de cel mult 7 zile.

Conjugarea DNP cu albumină serică bovină (ASB). Conjugarea albuminei serice bovine cu 2,4-dinitrofenol (DNP) s-a făcut utilizînd un raport de amestecare DNP-ASB în proporţie

de 1 : 5, utilizînd tampon carbonat-bicarbonat, pH 9,5, 0,1 M. Reacţia s-a efectuat la temperatura camerei, timp de 16—20 ore. DNP-ul nereacţionat a fost eliminat prin gel filtrare pe Sephadex G-25 sau G-50, în tampon fosfat salin (TFS). Conjugatul DNP-ASB purificat a fost utilizat pentru imunizarea animalelor.

Conjugarea fragmentului Fab din anticorpi anti-eritrocite cu DNP. S-a izolat IgG din ser de iepure anti-hematii de oaie (Institutul „I. Cantacuzino") prin precipitare cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe DEAE-celuloză, pH 8,0, 0,02 M. IgG-ul anti-eritrocite de oaie a fost hidrolizat cu papaină la pH 7,0 utilizînd cisteina ca activator (6). Fragmentul Fab a fost izolat prin cromatografie de afinitate utilizînd SpA-Sepharoză (7).

Marcarea cu DNP a fragmentului Fab anti-eritrocite de oaie s-a făcut în condiţiile arătate pentru ASB.

Îmbrăcarea eritrocitelor de oaie cu DNP-Fab anti-eritrocit de oaie. S-a utilizat tehnica descrisă de A. Sulica şi colab. (8). Se amestecă eritrocitele de oaie cu conjugatul DNP-Fab în condiţii care asigură îmbrăcarea eritrocitului cu haptena prin intermediul fragmentului Fab. Excesul DNP-Fab nereacţionat a fost îndepărtat prin spălări repetate. Eritrocitele îmbrăcate cu DNP (E-DNP) au fost utilizate pentru determinarea cantitativă a anticorpilor anti-DNP utilizînd tehnica hemaglutinării.

Imunizarea iepurilor cu DNP-ASB. Animalele au fost injectate intradermic cu DNP-ASB emulsionat în adjuvant Freund complet. Emulsia a conţinut 1 mg antigen în 1,5 ml TFS şi 1,5 ml adjuvant Freund complet, injectată în locuri multiple pe flancurile animalelor. După 2 săptămîni s-a repetat injectarea cu aceeaşi doză de antigen. La 10—14 zile de la cea de-a doua injectare iepurii au fost sîngeraţi.

Imunizarea iepurilor cu hematii de oaie. Animalele au fost imunizate cu 1 ml suspensie de hematii de oaie 5%, intravenos. După fiecare injecţie s-a crescut concentraţia hematiilor la 10, 15, 20 şi 25%; fiecare animal a primit săptămînal 2 injecţii intravenoase de hematii de oaie. Prima sîngerare s-a făcut la o săptămînă de la începerea imunizării, a doua sîngerare după 14 zile şi a treia sîngerare la 24 de zile.

Imunizarea iepurilor cu peroxidază. Animalele au primit 1 mg peroxidază în 1,5 ml TFS emulsionată în 1,5 ml adjuvant Freund incomplet. S-a repetat aceeaşi doză la 15 zile, respectiv 35 de zile de la prima injectare. S-au sîngerat animalele la 14 zile de la injecţie a doua, respectiv a treia.

Administrarea adjuvantului Freund complet. Au fost injectaţi iepuri intradermic cu adjuvant Freund complet, în cantitate egală cu cea administrată animalelor cu ocazia imunizării cu peroxidază, respectiv, DNP-ASB. Adjuvantul a fost administrat, sub formă emulsionată, de 3 ori, cu un interval de două săptămîni între fiecare injecţie. Sîngerările s-au practicat la 10—14 zile de la administrarea adjuvantului.

Metoda imunodifuziei radiale (metoda Mancini). S-a utilizat pentru determinarea concentraţiei de IgG în serurile de iepure (9).

Tratarea celulelor cu ser. Celule (5×10^6) au fost suspendate în 0,4 ml mediu IC-65 şi s-a adăugat 0,1 ml ser sau antiser. După incubare pe ghiaţă, timp de 45 de minute, celulele au fost spălate de 2 ori cu mediu IC-65 la rece, conţinînd azidă de sodiu 1 mg/ml. Depozitul celular spălat a fost resuspendat la concentraţia celulară dorită.

Formarea rozetelor. La 0,5 ml de celule tratate sau netratate cu ser, conţinînd 10^6 celule s-a adăugat 0,05 ml de reactiv ES, conţinînd 5×10^7 eritrocite. Amestecul a fost centrifugat la 4°C, pentru 10 minute (300 g) şi a fost incubat la 4°C, pentru 1 oră. Depozitul a fost resuspendat prin pipetare şi s-a adăugat 0,2 ml de soluţie de formaldehidă 2% în TFS. După 10 minute s-a adăugat 0,2 ml dintr-o soluţie de albastru de toluidină 0,2% în TFS. Au fost numărate la microscop mai mult de 200 de celule rozetate sau nerozetate. Celulele cu mai mult de trei eritrocite pe suprafaţa lor au fost considerate rozetate. Toate experimentele au fost executate în duplicat.

REZULTATE

Citofilia serurilor la animalele imunizate cu DNP-ASB. S-a testat capacitatea limfocitelor de şoarece de a lega IgG din serul iepurilor înainte şi după imunizare cu DNP-ASB în adjuvant Freund complet. Citofilia a crescut la 6 din cele 7 animale imunizate; creşterea citofiliei a fost paralelă cu creşterea concentraţiei globale de IgG şi a concentraţiei anticorpilor specifici anti-DNP (tabelele 1 şi 2).

Tabelul 1

Variația citofiliei în serurile iepurilor imunizați cu DNP-ASB în adjuvant Freund complet

Iepure [2]	Citofilia [2] serurilor obținute la sîngerarea :		
	I-a [3]	a II-a [4]	a III-a [5]
1	55,5	58,5	76,9
2	31,8	46,8	66,8
3	30,3	35,0	26,6
4	25,9	37,3	60,9
5	24,1	36,5	45,5
6	21,5	29,9	46,6
7	16,4	26,1	36,2

[1] Iepuri Chinchilla imunizați cu DNP-ASB (1mg) în asociație cu adjuvant Freund complet (ziua 0) și rapelați la 15 zile.
[2] Procent de rozete ES după tratarea limfocitelor splenice de șoarece (5×10^6 celule în 0,5 ml mediu) cu 0,1 ml din serurile de testat.
[3] Serurile obținute înainte de imunizarea animalelor.
[4] Serurile obținute la 14 zile de la imunizarea primară (ziua 0).
[5] Serurile obținute la 15 zile de la imunizarea secundară (ziua a 15-a).

Tabelul 2

Variația citofiliei în raport cu concentrația IgG-ului și a anticorpilor anti-DNP în serul iepurilor imunizați cu DNP-ASB în adjuvant Freund complet

Recoltarea sîngelui	Citofilia [1]	Concentrația IgG [2] (mg/ml)	Concentrația anti-DNP [3] (log T)
Înainte de imunizare	29,3±2,7	11,0	1,0
La 15 zile de la imunizare	38,8±4,2	13,9	3,2
La 30 zile de la imunizare	51,3±6,6	26,0	5,5

[1] Procentul de rozete ES după tratarea limfocitelor splenice de șoarece cu seruri de iepure. Valorile reprezintă media a 7 seruri anti-DNP.
[2] A fost determinată prin tehnica Mancini.
[3] A fost determinată prin tehnica hemaglutinării.

Citofilia la animale imunizate cu eritrocite de oaie. S-a testat capacitatea limfocitelor de șoarece de a lega IgG din serurile iepurilor înainte și după imunizare intravenoasă cu eritrocite de oaie. Din rezultatele prezentate în tabelul 3 se observă că imunizarea animalelor cu eritrocite de oaie fără adjuvant Freund complet nu determină o creștere semnificativă a citofiliei, deși a fost observată o creștere a concentrației de anticorpi specifici anti-hematii de oaie.

Citofilia serurilor la animale imunizate cu peroxidază. S-a testat capacitatea limfocitelor de șoarece de a lega IgG din serurile iepurilor înainte și după imunizare cu peroxidază în adjuvant Freund incomplet. Din rezultatele obținute și prezentate în tabelul 4 se observă că concentrația IgG-ului crește în urma imunizării și stimulării specifice și nespecifice a sistemului anticorpoformator. S-a înregistrat paralel cu creșterea concentrației de IgG, creșteri modeste în citofilie care nu sînt semnificative din punct de vedere statistic.

Citofilia serurilor la animale la care s-a administrat adjuvant Freund complet. S-a testat capacitatea limfocitelor de șoarece de a lega IgG din

Tabelul 3

Variația citofiliei în raport cu concentrația anticorpilor anti-eritrocite de oaie în serul iepurilor imunizați cu eritrocite de oaie

Recoltarea sîngelui	Citofilia [1]	Titrul anticorpilor [2] anti-eritrocite de oaie (log T)
Înainte de imunizare	21,5±3,0	1,0
7 zile de la imunizare	22,6±3,7	4,1
14 zile de la imunizare	26,7±3,9	5,5
24 zile de la imunizare	27,4±2,0	6,1

[1] Procent de rozete ES după tratarea limfocitelor splenice de șoarece cu serurile de iepure anti-eritrocit. Media a 8 seruri

[2] Titrul anticorpilor anti-eritrocite de oaie au fost determinate prin hemaglutinare.

Tabelul 4

Variația citofiliei în raport cu concentrația IgG-ului în serul iepurilor imunizați cu peroxidază în adjuvant Freund incomplet

Recoltarea sîngelui [1]	Citofilia [2]	Concentrația IgG [3]	Concentrația anticorpilor anti-peroxidază [4].
Înainte de imunizare	18,1±1,3	7,8	0
La 14 zile de la imunizare	20,3±3,2	9,8	1/8
La 28 zile de la imunizare	22,2±3,5	13,0	1/64

[1] Iepuri imunizați cu peroxidază în asociație cu adjuvant Freund incomplet (ziua 0) și rapelați la 15 zile.

[2] Media a 5 experimente.

[3] S-a utilizat tehnica Mancini.

[4] Diluția serului anti-peroxidază care precipită în dublă difuzie o soluție de peroxidază (0,1 mg/ml).

Tabelul 5

Variația citofiliei în raport cu administrarea adjuvantului Freund complet emulsionat în tampon fosfat salin fără antigen

Recoltarea sîngelui [1]	Citofilia [2]
Înainte de administrare	13,3±3,1
La 15 zile de la administrare	12,2±3,5
La 30 zile de la administrare	18,7±4,3

[1] Iepurii au fost injectați cu 1,5 ml adjuvant Freund complet emulsionat în TFS, în ziua zero și 15.

[2] Media a 4 experiențe.

serurile iepurilor înainte și după administrarea de adjuvant Freund complet în absența antigenului în condiții și în cantitate comparabile cu cele utilizate la imunizarea cu DNP-ASB în adjuvant Freund complet. Nu s-a observat creșterea citofiliei (tabelul 5).

DISCUȚII

Cantitatea de anticorpi citofili prezenți în ser depinde atît de afinitatea cît și disponibilitatea receptorilor Fc de pe celulele sanguine. Dacă aviditatea și disponibilitatea acestor receptori este ridicată, IgG-ul citofil seric poate scădea sub nivelul detectabil. Deoarece IgG-ul citofil există liber în ser, se poate presupune că acesta reprezintă o parte din populația de IgG citofil, și anume, aceea care posedă o afinitate mai scăzută pentru receptorii Fc.

Imunizarea animalelor produce creșterea IgG-ului citofil disponibil în sînge fără însă a modifica semnificativ procentul de celule care posedă IgG pe suprafața lor. Această comportare sugerează că creșterea IgG-ului citofil ar putea reprezenta un efect al modificării metabolizării acestei proteine. Modificarea ratei catabolice a IgG poate fi influențată prin imunizarea animalelor sau prin oricare altă acțiune care crește nivelul IgG-ului seric. Rezultatele obținute de noi au confirmat pe cele obținute mai de mult de Boyden și Sorkin (10) care au obținut o creștere a nivelului anticorpilor IgG citofili prin imunizarea animalelor cu albumină serică umană în adjuvant Freund complet. Nivelul anticorpilor citofili nu a crescut prin imunizare cu adjuvant Freund complet în absența antigenului, dar nici de antigene administrate în adjuvant Freund incomplet sau fără adjuvant Freund. Cu toate că natura chimică a antigenelor folosite a fost diferită se poate formula o ipoteză de lucru privitoare la condițiile necesare elicitării anticorpilor citofili, și anume asocierea unui antigen macromolecular cu adjuvant Freund complet. Aparent antigenul acționează concertat cu corpii microbieni din adjuvant asupra sistemului imunologic al gazdei, provocînd o creștere a concentrației IgG-ului și, deci, și a nivelului IgG-ului citofil.

Semnificația biologică a anticorpilor IgG citofili nu este încă pe deplin înțeleasă. Există evidențe că acești anticorpi pot să fie opsonizanți provocînd creșterea fagocitării unor celule-țintă diferite (în special, eritrocite) (3).

Rezultatele noastre fără a exclude explicațiile autorilor mai sus citați sugerează că prezența anticorpilor citofili în ser (IgG citofil) este rezultatul „izolării" unei fracțiuni de IgG în compartimentul de catabolizare al organismului. Cu alte cuvinte, noi considerăm că IgG-ul citofil liber reprezintă una și aceeași populație cu IgG care este destinată catabolizării.

Atît ipoteza lui Brambell (10) cît și cea a lui Gheție (11) consideră că o parte din moleculele de IgG trec din spațiul intravascular într-un compartiment de catabolizare și acest eveniment controlează catabolizarea IgG-ului. Cu alte cuvinte, evenimentul principal care controlează catabolizarea IgG-ului nu are loc în celulele catabolizatoare, ci este legat de tranziția de conformație a IgG de la forma nativă la cea modificată, precum și de echilibrul cantitativ care se stabilește între cele două forme.

Raportul dintre IgG catabolizată (IgGc) și cantitatea de IgG din spațiul intravascular (IgGi) este proporțional cu raportul dintre forma modificată (IgGmod) și cea nativă (IgGn), așa cum se indică în ecuația:

$$\frac{\text{IgGc}}{\text{IgGi}} = \text{K}\,\frac{\text{IgGmod}}{\text{IgGn}}.$$

Raportul dintre forma nativă și cea modificată este dependent de factorii care intervin în modificarea moleculei de IgG. Unul dintre aceștia este uzarea metabolică a moleculei de IgG care ar putea fi determinată printre altele, și de trecerea sa repetată din spațiul intravascular în cel extravascular peste celulele endoteliale ale capilarelor. Așa cum a fost postulat de Gheție (11) transportul transendotelial repetat al IgG-ului ar putea provoca în timp o alterare conformațională a structurii regiunii Fc care să fie recunoscută de receptorii Fc de pe celulele catabolizatoare.

Prezenţa moleculelor îmbătrînite de IgG a fost postulată atît în ipoteza lui Brambell cît şi în ipoteza lui Gheţie, dar aceste molecule nu au putut fi identificate în ser. Datele obţinute de noi ne permit să identificăm tentativ IgG modificată conformaţional cu IgG citofil. Conform acestei păreri, rata fracţională de catabolizare a IgG-ului va depinde de raportul dintre IgG-ul citofil şi cel nativ.

Mulţumesc dr. doc. Victor Gheţie pentru sprijinul continuu acordat şi asist. med. Mariana Caralicea pentru excelentul ajutor tehnic.

Prezentat la redacţie
la 21 iunie 1978

Institutul „V. Babeş" Laboratorul de Imunologie

THE INTERACTION OF CYTOPHILIC IgG ANTIBODIES WITH LYMPHOCYTE Fc RECEPTORS

SUMMARY

The level of cytophilic IgG antibodies in rabbit sera was significantly increased only by immunization with antigen associated with complete Freund adjuvant, while with antigens with or without incomplete Freund adjuvant no significant increase in IgG cytophilia was recorded despite the level of antibody was significantly higher. The results suggest that cytophilic IgG may represent the tiny IgG fraction designed for catabolism.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheţie, I. Moraru, A. Sulică, Maria Gherman, J. Sjöquist, Rev. roum. Biochim., **13**, 263 (1976).
2. Jabbar-S-Ahmed, Rev. roum. Biochim., **13**, 273 (1976).
3. S. V. Boyden, E. Sorkin, Immunology, **3**, 272 (1960).
4. Jabbar-S-Ahmed, St. Cerc. Biochim., **20**, *1* (1977).
5. V. Gheţie, K. Nilsson, J. Sjöquist, Eur. J. Immunol., **4**, 500 (1974).
6. R. Porter, Biochim. J., **73**, 119 (1959).
7. H. Hjelm, K. Hjelm, J. Sjöquist, FEBS Letters, **28**, 73 (1972).
8. P. Strausbauch, A. Sulică, D. Givol, M. Sela, Nature, **227**, 68 (1970).
9. G. Mancini, A. Carbonara, J. F. Heremans, Immunochemistry, **2**, 35 (1965).
10. F. W. R. Brambell, W. A. Hemings, I. G. Morris, Nature, **203**, 1352 (1964).
11. V. Gheţie, St. Cerc. Biochim., **15**, 167 (1972).

SUPRAVIEŢUIREA ŞI MODIFICĂRI BIOCHIMICE LA *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* Lmk. SUB ACŢIUNEA ŞOCULUI DE TEMPERATURI CRESCUTE

MARIA MÎRZA*) MIHAIL ŞERBAN**)

Rezumat. *Mytilus galloprovincialis* supravieţuieşte la şocuri termice de la 4°C la 30°C şi de la 9°C la 30°C timp de 50 respectiv 140 de ore. În primele ore de stress, masculii au o mortalitate de 2,5 ori mai mare decît femelele. Rezistenţa exemplarelor tinere este mai mare decît a celor bătrîne. Cu cît intervalul între cele două limite de temperatură este mai mare, supravieţuirea este mai mică.
Şocul termic de la 21°,5 la 30° provoacă în 30 ore o creştere semnificativă a activităţii catalazei din muşchiul adductor şi hepatopancreas. După 60 de ore, această activitate scade semnificativ, iar cantitatea de proteine din organele testate şi conţinutul de acid lactic din hemolimfă cresc semnificativ.
Intensitatea modificărilor diferă în funcţie de ţesut şi sex.

Rezolvarea pe plan mondial a problemei necesităţilor crescute de energie a dus la construirea de numeroase termocentrale şi instalaţii de exploatare petrolieră şi minieră pe platformele continentale ale mărilor şi oceanelor, care au ca rezultat inevitabil poluarea termică a unor zone din mediul marin (1).

Deoarece se cunosc puţine date despre capacitatea diferitelor specii de a rezista şi de a se adapta la condiţiile de temperatură ridicată, generate de poluarea termică, ne-am propus să urmărim supravieţuirea şi modificarea activităţii catalizei, precum şi conţinutul în acid lactic şi proteine la *Mytilus galloprovincialis* în condiţiile unor şocuri de temperatură, cu limita superioară la +30°C.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe *Mytilus galloprovincialis* colectat de la Agigea (Constanţa Sud) de pe substrat stîncos şi de la adîncimea de 1 m. Exemplarele testate pentru supravieţuire au fost colectate în luna aprilie 1976 şi au avut dimensiuni între 2 şi 8 cm aşa cum se găsesc distribuite în populaţiile naturale.

După colectarea şi curăţirea de epibioză a cochiliilor, s-au introdus animalele în acvarii cu apă de mare în următoarele condiţii : termostatare cu precizie de ±0,2°C, salinitatea apei de 14,47‰, conţinutul în O_2/30°C de 5,3 ml O_2/litru, pH 7,7—7,9, densitatea animalelor 2/litru. În timpul experienţelor, animalele au fost menţinute la întuneric, nealimentate, iar apa a fost schimbată la 24 ore.

Acţiunea şocului termic între 4° — 30°C s-a testat pe 1660 exemplare, iar a celui între 9° şi 30°C pe 1340 exemplare. Lotul martor a fost alcătuit din 300 exemlare de *Mytilus galloprovincialis* menţinute în apă de mare la + 4°C respectiv la + 9°C.

Pentru determinările de acid lactic, catalază şi proteine solubile (în condiţii de stress) s-au folosit exemplare de 4,5—5 cm, colectate în luna august 1976.

St. cerc. biochim., 21, 2, 175—181 (1978)

În momentul recoltării animalelor pentru determinările biochimice apa de mare a prezentat salinitatea de 17,7‰, temperatura medie 21°, 3C, şi conţinutul de oxigen 5,86 ml O_2/litru.

După o acomodare de 24 ore în acvarii cu apă de mare aerată la temperatura de 21°,5 ± ± 0°,5 C, animalele au fost repartizate în următoarele loturi experimentale de 30—50 indivizi, cu o densitate de 2 indivizi/litru :

I lot — martor — ţinut în apă de mare la 21°,5 ± 0°,5C/60 ore.

II lot — ţinut în apă de mare la 30° ± 0°,5C/15 ore.

III lot — ţinut în apă de mare la 30° ± 0°,5C/30 ore.

IV lot — ţinut în apă de mare la 30° ± 0°,5C/60 ore.

Pentru a obţine rezultate comparabile, deoarece în experienţele noastre animalele nu au fost hrănite, loturile III şi IV au fost ţinute în apă de mare la 21°,5 ± 0°,5 C timp de 15, respectiv 30 de ore înainte de aşezarea lor la temperatura de 30°C. Astfel durata şederii în laborator a totalizat acelaşi număr de ore pentru toate animalele. Fotoperiodismul a fost menţinut la 14 ore de lumină şi 10 ore de întuneric. Apa de mare s-a schimbat la intervale de 12 ore.

Ţesuturile au fost recoltate după deschiderea valvelor, scurgerea şi tamponarea cu hîrtie de filtru a apei interpaleale. Hemolimfa s-a obţinut prin crestarea repetată a mantalei. Ţesuturile s-au omogenizat şi s-au extras cu apă (1/3 g/v) timp de o oră la + 4°C. După aceasta, omogenatele s-au centrifugat 30 minute la 3000 ture/minut.

Dozarea catalazei din extractul apos al omogenatelor de ţesuturi s-a efectuat prin metoda titrimetrică cu $KMnO_4$ (3).

Condiţiile de lucru au fost diferite în funcţie de organul testat şi anume :

— hepatopancreas : 7 ml tampon fosfat 0,2 M pH 6,5, 0,1 ml extract, 5 ml H_2O_2 1%, incubare 10 minute la + 17°C.

— muşchi adductor : 7 ml tampon fosfat 0,2 M pH 5,9, 0,2 ml extract, 2 ml H_2O_2 1%, incubare 30 minute la + 17°C.

Proteinele din extractele de ţesuturi s-au dozat prin metoda Lowry (4). Acidul lactic din hemolimfă s-a determinat prin metoda Barker (5).

Metoda Winkler (6) s-a utilizat pentru dozarea conţinutului în O_2 al apei de mare.

Salinitatea apei de mare s-a determinat prin metoda Strikland (7), utilizînd tabelele oceanologice Zubov (8).

Citirile s-au efectuat la fotocolorimetrul FEK 56 M.

pH-ul s-a determinat cu pH-metrul Radelkis tip OP.

Calculul statistic s-a efectuat prin aplicarea testului „T" al lui Student. Valorile aberante au fost eliminate conform criteriului lui Chauvenet (9).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele înregistrate în experienţele de supravieţuire a nevertebratului *Mytilus galloprovincialis* la şocul termic de la 4°C la 30° ± 0 ; 2C arată că temperatura de 30°C este letală (tabela 1) pentru condiţiile experimentale descrise mai sus. Procentul de mortalitate de 50% s-a înregistrat după 32 de ore. Supravieţuirea maximă a fost de 50 de ore. Analiza supravieţuirii pe sexe la acest şoc termic arată că în primele 10 ore de expunere rezistenţa femelelor a fost mult mai mare decît a masculilor. La 7 ore de expunere, mortalitatea masculilor este dublă faţă de cea a femelelor.

În altă experienţă, prin restrîngerea intervalului de temperatură la şocul termic de la 9°C la 28°C, timpul de supravieţuire maxim a crescut la 140 de ore ; mortalitatea de 50% este atinsă la 65 ore de expunere. La mortalitatea de 50%, repartiţia pe clase de mărime a exemplarelor moarte a fost următoarea : 2—3 cm 4% ; 3—4 cm 13% ; 4—5 cm 36% ; peste 6 cm 47%. Procentul s-a calculat în raport cu numărul total de exemplare al clasei de lungime respectivă.

Se remarcă faptul că exemplarele bătrîne au o rezistenţă mică la şoc termic. Lucrările lui Kenedy (10) au arătat că exemplarele tinere ale moluştei bivalve *Mya arenaria* sînt mult mai rezistente la temperaturi crescute

(30°,9C) decît moluștele bătrîne din aceeași specie (30,0°C). Probabil că dependența între talia sau vîrsta animalului și rezistența la temperaturi ridicate se manifestă diferit după specificul experienței, deoarece literatura ne oferă și date ce sînt în contradicție cu observația făcută de noi.

Tabela 1

Supraviețuirea pe sexe la șoc termic (4° C – 30°C)

Timpul (ore)	Mortalitatea pe sexe (%)		Supraviețuirea
	Masculi	Femele	cumulată
1	2,31	0,58	97,11
2	4,00	1,00	95,00
3	5,43	1,63	92,94
4	7,60	2,71	89,68
6	8,00	2,97	89,03
7	8,00	3,53	88,47
20	8,50	13,00	78,50
27	19,50	16,00	64,50
45	46,50	46,00	7,50
50	51,30	48,70	0,00

Astfel după Waugh (11), mortalitatea latentă consecutivă unui stress termic nu prezintă nici o dependență de talie la *Mytilus edulis*, *Mya arenaria* și *Modiolus demissus*.

Activitatea specifică a catalazei din lotul martor menținut la 21°,5 C, prezintă o evidentă modificare în funcție de natura țesutului testat și a sexului animalului (fig. 1.).

Femelele manifestă activități catalazice mai mari în hepatopancreas și mai mici în mușchiul adductor, în raport cu valorile înregistrate pe țesuturile similare la masculi.

De asemenea, catalaza din extractul de hepatopancreas diferă de cea din mușchiul adductor prin pH-ul optim de 6,5 și respectiv de 5,9. Loturile de femele supuse șocului termic de la 21°,5C la 30°C și menținute la 30°C timp de 15, 30 și 60 ore reprezintă o diminuare progresivă a activității catalazei din mușchiul adductor; în hepatopancreas, activitatea enzimatică crește de 2,7 ori în primele 30 ore apoi se înregistrează un declin (tabela 2).

Fenomenul prezintă o desfășurare analoagă la țesuturile provenite de la masculi. Modificările înregistrate au fost semnificative din punct de

Tabela 2

Valorile medii ale activității catalazei (*n* moli H_2O_2/min/mg proteină) după expunerea la un șoc termic de la 21,5 la 30° C

Proba		Martor (21°,5C/60 ore)	Timp de expunere la 30°C		
			15 ore	30 ore	60 ore
Mușchi adductor	♀	4264±77	2894±107*)	2852±114*)	2000±50**)
Mușchi adductor	♂	4705±70	3235±75	2822±85*)	1452±36**)
Hepatopancreas	♀	4500±75	9323±177*)	12265±186**)	5676±89**)
Hepatopancreas	♂	4970±59	8529±69*)	12058±130**)	4626±37

*) = $P < 0,05$ **) = $P < 0,001$ Semnificativ la $P < 0,05$ $n = 25$

Toate datele sînt comparate cu valorile de referință ale lotului martor.

vedere statistic şi indică faptul că *Mytilus galloprovincialis* îşi modifică puternic metabolismul oxigenului în ţesuturi sub acţiunea şocului termic.

În condiţii de creştere bruscă a temperaturii, Widdows şi Bayne (12, 13) au arătat că *Mytilus edulis* reacţionează prin creşterea consumului de oxigen şi utilizarea rezervelor proprii de energie chiar în condiţii de hrănire în exces, ceea ce înseamnă un dezechilibru energetic pronunţat.

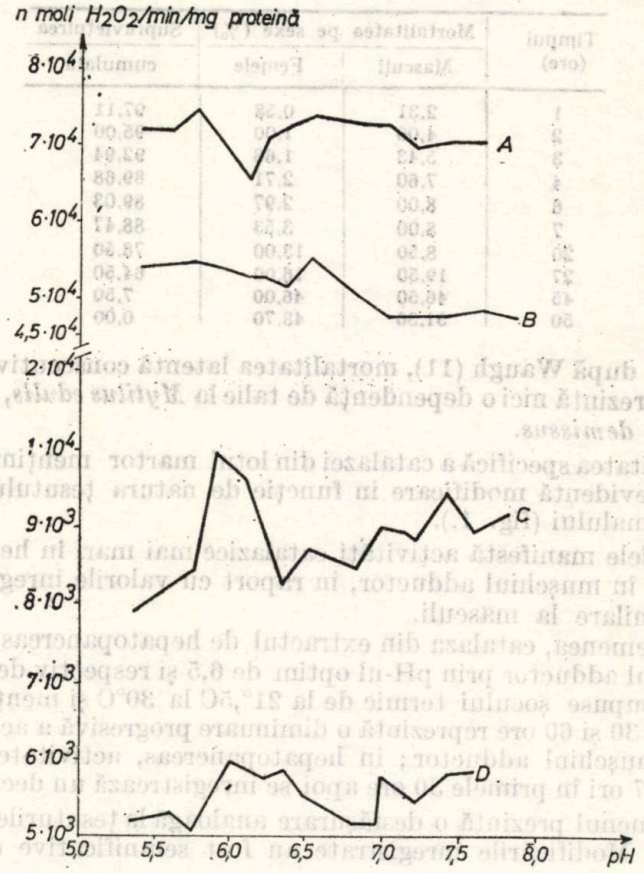


Fig. 1. — Acţiunea pH-ului asupra activităţii catalazei din diferite ţesuturi de *Mytilus galloprovincialis*.
A. Hepatopancreas femele; *B*. Hepatopancreas masculi; *C*. Muşchi adductor masculi; *D*. Muşchi adductor femele.

Bayne şi Thompson (14) au arătat, în experienţe cu caracter cronic, că stressul termic şi nutritiv determină la *Mytilus edulis* pierderea rezervelor de glucide şi de proteine, în timp ce rezervele de lipide nu sînt afectate (pierderile rezervelor energetice sînt mai pronunţate în ţesuturile germinale — manta — decît în ţesuturile somatice).

Gabbott şi Bayne (15) fac observaţia că pierderea rezervelor de glucide sau de proteine în condiţii de stress termic şi nutriţional depinde

de sezon, respectiv de faza de reproducere. Astfel, vara cînd rezervele de glicogen sînt minime și consumul de O_2 este scăzut, stressul termic și nutrițional duc la accentuarea scăderii consumului de O_2 și la scăderea proteinelor; iarna, cînd rezervele de glicogen sînt mari și consumul de O_2 crescut, stressul termic și nutrițional determină pierderea masivă a rezervelor de glucide și intensificarea consumului de O_2. Aceeași variație sezonieră a efectelor stressului termic asupra rezervelor de glicogen și de proteine a fost descrisă și pentru *Crassostrea virginica* (Quick) (1971) citat de Gabbott și Bayne (15).

Determinările noastre privind modificarea conținutului de proteine solubile în mușchiul adductor și în hepatopancreasul de midie (tabela 3)

Tabela 3

Dinamica conținutului de proteine (mg/ml) din extractele de organe de *Mytilus Galloprovincialis* expus la un șoc termic de la 21°,5 la 30°C

Proba	Martor (21°,5C/60 ore)	Timp de expunere la 30°C		
		15 ore	30 ore	60 ore
Hepatopancreas ♂	16,98±0,30	9,92±0,13*)	5,73±0,08**)	14,15±0,27**)
Mușchi adductor ♂	10,29±0,10	6,94±0,5*)	8,6±0,50*)	9,5±0,18
Hepatopancreas ♀	14,55±0,50	15,80±0,11	5,85±0,10**)	12,35±0,13**)
Mușchi adductor ♀	10,07±0,10	9,82±0,21	6,91±0,30**)	14,55±0,3**)

* = P <0,05 ** = P <0,001 Semnificativ la $P < 0{,}05$ $n = 25$

Datele obținute la 15 și 30 ore de expunere sînt comparate cu valorile de referință ale lotului martor. Datele obținute la 60 ore, sînt comparate cu valorile obținute la 30 de ore de expunere.

arată că șocul termic afectează puternic rezervele de proteine. Aceste schimbări au loc cu viteze diferite la masculi și femele. Se remarcă și o puternică specificitate de țesut.

După 30 ore de stress, în toate organele testate are loc o scădere semnificativă a conținutului în proteine. La loturile menținute 60 de ore sub stress se înregistrează o creștere semnificativă a conținutului în proteine solubile, în raport cu loturile menținute 30 de ore. În metoda Lowry, colorația cu reactivul Folin Ciocâlteau este dată de triptofan, tirozină, compuși fenolici, acidul uric, guanidină, xantină. Este posibil ca, prin modificarea metabolismului unora din acești compuși, organismul moluștei să tindă la contracararea efectului șocului termic. Acumularea de proteine sugerează o modificare în capacitatea organismului de a le mobiliza în paralel cu creșterea duratei de acțiune a stressului.

La 30°C, moluștele găsesc în apă mai puțin oxigen decît în condiții normale. În lipsa oxigenului, moluștele recurg facultativ la anaerobioză cînd își consumă rezervele de glicogen și de aminoacizi : acid glutamic, acid aspartic, leucină, valină, izoleucină, prolină. Nevertebratele marine produc rareori lactat ca produs final al anaerobiozei, în mod obișnuit acest produs neformîndu-se (16).

Mantaua de stridie *Crassostrea virginica* (17) produce de 10 ori mai rapid acid succinic marcat decît acid lactic din glucoză ^{14}C.

Humphrey (18) nu a putut detecta producerea de acid lactic în mușchiul obosit al acestei moluște. Dehidrogenaza lactică (16) (19) din extractele de mușchi de stridie catalizează reducerea piruvatului mai greu și oxidarea lactatului mai rapid decît la alte bivalve.

Dinamica acidului lactic din hemolimfă în cazul stressului termic testat arată că în primele 15 ore se înregistrează o creștere nesemnificativă față de lotul martor. După 30 ore creșterile înregistratoare sînt de la 1727 ± 65 la 1945 ± 45 mg acid lactic /100 ml hemolimfă pentru masculi și de la 1718 ± 50 la 1900 ± 62 pentru femele.

După 30 de ore, cantitățile de acid lactic acumulate au fost și mai mari: 2109 ± 43 mg% pentru masculi și respectiv 2254 ± 45 mg% pentru femele ($P < 0,05$).

Se remarcă astfel că în urma șocului termic se produce în hemolimfă o acumulare de acid lactic, fapt neobișnuit pentru metabolismul glucidic al moluștelor bivalve.

CONCLUZII

1. — Temperatura de + 30°C este o temperatură letală pentru *Mytilus galloprovincials*. Cu cît intervalul între temperatura inițială și finală a șocului termic este mai mare, timpul de supraviețuire este mai mic. Pentru șocurile de la 4°C la 30°C și de la 9°C la 30°C mortalitatea de 50% se înregistrează după 32 ore, respectiv 56 ore.

2. — Animalele bătrîne au o rezistență mai mică la șoc termic decît cele tinere.

3. — Femelele sînt mai rezistente la șocuri termice de scurtă durată decît masculii.

4. — S-a evidențiat o specificitate de țesut și o specificitate de sex în ceea ce privește activitatea catalazei și mobilizarea rezervelor de proteine solubile. Aceste modificări s-au produs mai intens în hepatopancreas decît în mușchi și mai rapid în primele ore de stress la femele decît la masculi.

5. — Stressul termic între 21°,5—30°C produce efecte drastice asupra metabolismului lui *Mytilus* deoarece se înregistrează:

— la 30 ore o creștere și la 60 ore o diminuare semnificativă a activității catalazei din hepatopancreas; catalaza din mușchiul adductor este inhibată parțial.

— la 30 de ore o diminuare și la 60 de ore o creștere semnificativă a concentrației proteinelor din toate țesuturile testate.

— o creștere în timp a conținutului de acid lactic din hemolimfă.

6. — Dozarea activității catalazei poate constitui un test rapid și eficient pentru detectarea efectelor poluării termice asupra lui *Mytilus*.

Prezentat la redacție la 15 martie 1978

*) *Institutul Român de Cercetări Marine Constanța. Laboratorul de Ecologie) Culturi și Aclimatizări — Agigea.*
**) *Facultatea de Medicină Veterinară București Laboratorul de biochimie.*

THE SURVIVAL AND BIOCHEMICAL TRANSFORMATIONS FROM *MYTILIUS GALLOPROVINCIALIS* Lmk. UNDER HIGH TEMPERATURES SHOCKS.

SUMMARY

Mytilus galloprovincialis at temperature shocks from 4°C to30°C and 9°C to 30°C, survives 50 and 140 hours respectively. In the first hours of the exposing the males die faster than the females and the resistance of the young is greater than that of the old. When the temperature gap is longer the survival period is shorter. The shock between 21.5 to 30°C after 30 hours induced a significant increase of the hepatopancreas catalase activity, and a diminution of this activity in the adductor muscle. After 60 hours this activities diminished but Lowry's protein from tested organs and the hemolimph lactic acid increased. The intensity of the transformations varies in accordance with the tissue and sex.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Eklund, Bull. A. J. E.A., **16**, 1 (1974).
2. F. E. J. Fry, *Termobiology*, Ed. A. H. Rose, New York 1967, p. 153.
3. A. N. Bach, C. R. Zubkova, C. R. Acad. Sci. Paris. **171**, 967 (1920).
4. O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
5. S. B. Barker, W. H. Summerson, J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
6. * * *, *Lucrări practice de fiziologia plantelor*. Ed. didactică și pedagogică — București, 1965, p. 153.
7. J. D. H. Strikland, T. T. Parsons, *A practical handbook of Sea Water Analysis*. Ed. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 1968, p. 17.
8. H. H. Zubov, H. N. Cighirin, *Okeanologiceskie tablitzi*. Gidrometeorologiceskoe izdatelistvo, Moskva, 1940.
9. M. Lamotte, *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*. Masson, Paris, 1967.
10. V. S. Kennedy, Ches. Sci., **12**, 193 (1971).
11. D. L. Waugh, Can. J. J. Zool., **53**, 1658 (1975).
12. J. Widdows, J. Comp. Physiol., B, **105**, 115 (1967)
13. B. L. Bayne, R. J. Thompson, J. Widdows, *Effects of temperature on ectothermic organisms*. Ed. W. Wieser, Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1973, p. 181.
14. B. L. Bayne, R. J. Thompson, Heegoländer wissensch. Merresuntersuch **20**, 526 (1970).
15. P. A. Gabbott, B. L. Bayne, J. Mar. Biol. Ass. U. K. **53**, 269 (1973).
16. P. W. Hochachka, *Biochemical and Biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press, New York, 1975, **2**, p. 107.
17. J. W. Simpson, J. Awapara, Comp. Biochem Physiol., **18**, 537 (1966).
18. G. H. Humphrey, J. Expte., Biol. Med. Sci., **28**, 151 (1950).
19. C. S. Hammen, Am. Zoologist, **9**, 309 (1969).

THE SURVIVAL AND BIOCHEMICAL TRANSFORMATIONS FROM MYTILUS CALIFORNIANUS Lmk. UNDER HIGH TEMPERATURES SHOCKS.

SUMMARY

Mytilus californianus at temperature shocks from 4°C to 30°C and 8°C to 30°C, survives 50 and 110 hours respectively. In the first hours of the exposing the mules die faster than the females and the resistance of the young is greater than that of the old. When the temperature gap is longer the survival period is shorter. The shock between 22.5 to 30°C after 30 hours induced a significant increase of the hepatopancreas catalase activity, and a diminution of this activity in the adductor muscle. After 50 hours this activities diminished but Lowry's protein from tested organs and the hemolimph lactic acid increased. The intensity of the transformations varies in accordance with the tissue and sex.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Ellis, Biol. A. J. E.A., 16, 1 (1974).
2. F. L. J. Fry, Tremblay, Ed. A. H. Rose, New York 1967, p. 152.
3. A. S. Black, C. R. Zenkova C. R. Acad. Sci. Paris, 171, 967 (1970).
4. O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
5. S. B. Banks, W. H. Spoonhour, J. Biol. Chem., 138, 659 (1941).
6. ***, Lucrări practice de fiziologie animală. Ed. didactică și pedagogică – București, 1965, p. 153.
7. J. D. H. Strickland, T. T. Parsons, A practical handbook of Sea Water Analysis, Ed. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 1965, p. 17.
8. H. H. Zinoy, I. N. Gunnus, Определитель Ed. Советского океанологического института, Москва, 1910.
9. M. Lamotte, Initiation aux méthodes statistiques en biologie, Masson, Paris, 1967.
10. V. S. Kinkaev, Ches. Sci., 12, 193 (1971).
11. D. L. Watson, Can. J. Zool., 53, 1653 (1975).
12. J. Winbows, J. Comp. Physiol., B. 103, 113 (1975).
13. E. J. Bayne, R. J. Thompson, J. Windows, Effects of temperature on reproduction organisms.
Ed. W. Wieser, Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1973, p. 181.
14. B. L. Bayne, P. J. Thomson, Hesgoländer wissensch. Meeresuntersuch 20, 328 (1970).
15. P. A. Gabbott, B. L. Bayne, J. Mar. Biol. Ass. U. K, 53, 269 (1973).
16. P. W. Hochachka, Biochemical and Biophysical perspectives in marine biology, Academic Press, New York, 1975, p. 107.
17. J. W. Sussos, J. Varanus, Comp. Biochem Physiol., 16, 837 (1966).
18. C. J. Bernheim, J. Exper. Biol. Mad. Sci., 58, 571 (1969).
19. C. S. Hanson, Am. Zoologist, 9, 309 (1969).

ACŢIUNEA DODECILSULFATULUI DE SODIU ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI DIN FRUNZELE DE PORUMB

CONSTANŢA MUŞOLAN

Rezumat. Frunzele de porumb imersate în soluţii de SDS de diferite concentraţii cedează prin presare cantităţi mai mari de apă şi acizi nucleici (în special ARNs), decît frunzele imersate în apă. Efectul depinde de concentraţia intracelulară a detergentului, fiind maxim în cazul SDS 2%. Datele experimentale obţinute sînt explicate prin prisma teoriei biostructurale a materiei vii.

O serie de lucrări au arătat că frunzele de porumb imersate în soluţii de inhibitori metabolici cedează prin presare ulterioară cantităţi mai mari de apă şi substanţe hidrosolubile, în comparaţie cu cele imersate în apă (1)(2)(3)(4)(5). Noi înşine am constatat un fenomen asemănător în cazul acizilor nucleici: inhibitorii metabolici folosiţi (cloramfenicolul, fluorura de sodiu şi arsenitul de sodiu) au avut efecte specifice de eliberare din frunzele de porumb a unor cantităţi diferite ale anumitor specii moleculare de acizi nucleici (6).

Aceste observaţii pot fi explicate prin prizma teoriei biostructurale a materiei vii, ţinînd seama de unele premize ale acesteia: materia vie este reprezentată de coexistenţa în echilibru a biostructurii şi soluţiei intracelulare; soluţia intracelulară este sediul reacţiilor biochimice prin care se furnizează energia necesară menţinerii integrităţii biostructurii. Urmează că inhibitorii metabolici pătrunşi în ţesutul viu, scăzînd aportul de energie celulară, determină o destrămare parţială a biostructurii, cu eliberarea unor cantităţi corespunzătoare de apă şi alte componente (7).

Dealtfel, din punctul de vedere al teoriei biostructurale, orice substanţă capabilă să interacţioneze cu soluţia intracelulară sau direct cu unele componente ale biostructurii, poate avea repercusiuni asupra stării de integritate ale acesteia. Astfel, detergenţii, prin caracteristicile lor tensioactive, ar putea avea unele efecte asupra ţesuturilor vii, la nivelul diferitelor componente. În lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim acţiunea dodecilsulfatului de sodiu (SDS) asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb, cu scopul de a verifica teoria biostructurală în cazul particular al acestor compuşi, de importanţă specială pentru celula vie. Determinările noastre au vizat atît aspectul cantitativ, cît şi cel calitativ, al efectului asupra diferitelor forme moleculare de acizi nucleici.

MATERIAL ŞI METODE

100 g plantule de porumb (hibrid simplu HS 304) în vîrstă de 10—12 zile se introduceau cu tulpinile în soluţii apoase de SDS de diferite concentraţii (1%, 2%, 5%); probele de control se introduceau în apă distilată. După 24 ore la temperatura camerei, plantulele se scoteau din soluţii, se spălau cu apă, se tamponau cu hîrtie de filtru.

Plantulele s-au stors în presa hidraulică Hafico, la o presiune de 150 atm, timp de 10 min. Sucurile obținute s-au centrifugat la rece, la 1500 rpm, s-au măsurat și s-au folosit pentru dozarea și analiza calitativă a acizilor nucleici.

Dozarea acizilor nucleici s-a făcut după o modificare (7) a metodei Ogur-Rosen (8).

Extracția acizilor nucleici s-a făcut cu dietilpirocarbonat-dodecilsulfat de sodiu, după Solymossy și col (9).

Gelfiltrarea pe Biogel P—100 s-a făcut pe coloane (60 × 1,5 cm) cu o viteză de eluție de 20 ml/h, folosind Tris—HCl pH 7, 4; 0,05 M; $MgCl_2$ 5 mM.

Electroforeza în gel de agaroză 1,5% s-a făcut după Vasu (10).

REZULTATE

Determinarea tensiunii superficiale a sucurilor stoarse din frunzele de porumb întregi, ca și — separat — din porțiunea imersată, respectiv aeriană a acestora, arată că pătrunderea detergentului în frunze depinde de concentrația lui în soluția de imersie, concentrația optimă fiind de 2% (tabela 1).

Tabela 1

Tensiunea superficială a sucurilor stoarse din frunzele de porumb, imersate în apă și în SDS 1% — 5%

Proba	Număr picături/min		
	Frunze întregi	Partea imersată	Partea aeriană
Martor	94	93	93
SDS 1%	125	160	104
SDS 2%	150	200	123
SDS 5%	150	210	118

Volumele de suc stors din frunzele de porumb tratate cu SDS, întregi, precum și din porțiunea imersată, respectiv aeriană, a acestora sînt proporționale cu tensiunea superficială a acestor sucuri (tabela 2).

Cantitățile și concentrațiile ADN, ARN și AN (acizi nucleici totali) în sucurile stoarse din frunzele de porumb tratate cu SDS de diferite concentrații sînt date în tabela 3. Se vede că sucurile stoarse din frunzele tratate cu SDS 2% conțin cantități de acizi nucleici apreciabil mai mari decît celelalte probe; totuși, concentrația acizilor nucleici în aceste sucuri nu este cu mult mai mare decît aceea din proba martor (tabela 3).

Tabela 2

Volumele de suc stoarse din 100 g frunze întregi precum și din partea imersată în soluție și partea aeriană ale acestor frunze, tratate cu SDS.

Proba	Volum suc (ml)			Exces suc (% martor)		
	Frunze întregi	Partea imersată	Partea aeriană	Frunze întregi	Partea imersată	Partea aeriană
Martor	39	30	42	—	—	—
SDS 1%	41	40	41	5	33	0
SDS 2%	54	61	50	38	100	19
SDS 5%	46	50	44	18	67	5

Tabela 3

Cantitățile și concentrațiile AN în sucurile stoarse din 100 g frunze de porumb tratate cu SDS 1%, 2% și 5%.

Proba	Volum suc (ml)	Cantitatea AN(μg)			Concentrația AN (μg/ml)		
		ADN	ARN	AN	ADN	ARN	AN
Martor	30	330	1080	1410	11	36	47
	30	240	900	1140	8	30	38
SDS 1%	43	473	1032	1505	11	24	35
	43	473	1032	1505	11	24	35
SDS 2%	53	530	2120	2650	10	40	50
	53	464	1802	2266	8	34	42
SDS 5%	58	580	1276	1856	10	22	32
	58	522	1160	1682	9	20	29

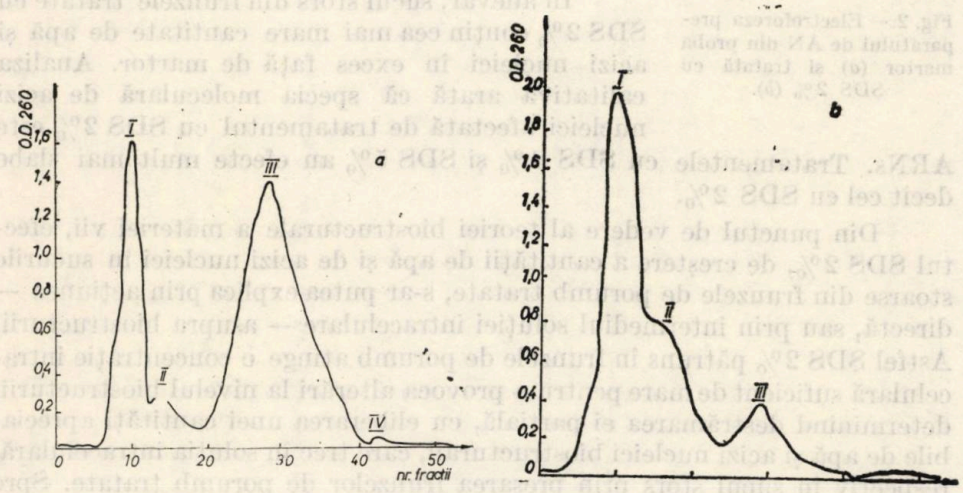


Fig. 1. — Gelfiltrarea pe Biogel P—100 a preparatului de AN din proba martor (*a*) și tratată cu SDS 2% (*b*).

Preparatul de acizi nucleici din sucul obținut din frunzele de porumb tratate cu SDS 2% prezintă o compoziție oarecum diferită de cea a preparatului omolog din frunzele martor. Astfel, în curba de gel filtrare de pe Biogel P— 100, palierul II este mai amplu, iar piscul III mult mai mic decît în curba probei martor (fig. 1). Electroforetic, preparatul de acizi nucleici din proba tratată prezintă o proporție mai mare de ARNs și o cantitate mai mică de contaminați în comparație cu preparatul de control (fig. 2).

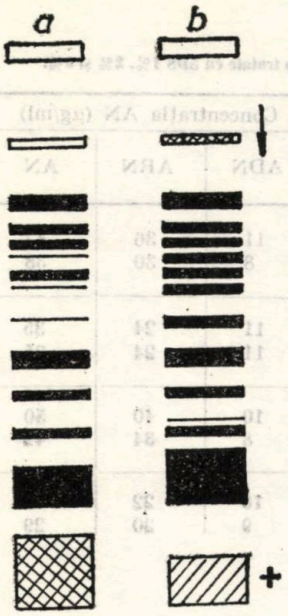


Fig. 2.— Electroforeza preparatului de AN din proba martor (*a*) și tratată cu SDS 2% (*b*).

DISCUȚII

Înainte de a discuta efectul SDS asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb, trebuie să observăm că — așa cum arată determinările de tensiune superficială — SDS pătrunde în frunze realizînd un gradient de concentrație între porțiunea imersată și porțiunea aeriană a acestora, deci concentrația detergentului nu este aceeași pe toată lungimea frunzelor. Pe de altă parte, pătrunderea SDS în frunzele de porumb depinde de concentrația lui în soluția de imersie, dar nu este direct proporțională cu aceasta. Sucurile din frunzele imersate în SDS 2% au o concentrație mai mare de detergent decît cele din frunzele imersate în SDS 1%, dar și decît cele din frunzele imersate în SDS 5%. Aceste observații trebuiesc luate în considerație în analiza efectului SDS asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb.

În adevăr, sucul stors din frunzele tratate cu SDS 2% conțin cea mai mare cantitate de apă și acizi nucleici în exces față de martor. Analiza calitativă arată că specia moleculară de acizi nucleici afectată de tratamentul cu SDS 2% este ARNs. Tratamentele cu SDS 1% și SDS 5% au efecte mult mai slabe decît cel cu SDS 2%.

Din punctul de vedere al teoriei biostructurale a materiei vii, efectul SDS 2%, de creștere a cantității de apă și de acizi nucleici în sucurile stoarse din frunzele de porumb tratate, s-ar putea explica prin acțiunea — directă, sau prin intermediul soluției intracelulare — asupra biostructurii. Astfel SDS 2% pătruns în frunzele de porumb atinge o concentrație intracelulară suficient de mare pentru a provoca alterări la nivelul biostructurii, determinînd destrămarea ei parțială, cu eliberarea unei cantități apreciabile de apă și acizi nucleici biostructurali, care trec în soluția intracelulară, respectiv în sucul stors prin presarea frunzelor de porumb tratate. Spre deosebire de SDS 2%, SDS 1% și SDS 5% își limitează acțiunea asupra biostructurii doar la nivelul apei, ceea ce s-ar putea explica prin faptul că în aceste cazuri concentrația intracelulară a detergentului nu atinge valoarea optimă pentru a afecta zone ale biostructurii ce conțin acizi nucleici. Faptul că SDS 1% și 5% acționează doar la nivelul apei biostructurale, în timp ce SDS 2% acționează atît la nivelul apei, cît și a acizilor nucleici biostructurali (iar dintre aceștia, ARNs este specia cea mai afectată), susțin ideea că apa are în biostructură o altă distribuție decît cea a acizilor nucleici, iar diferitele specii de acizi nucleici sînt distribuite neomogen în ansamblul biostructurii (11).

CONCLUZII

1. Acțiunea SDS asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb depinde de concentrația intracelulară a detergentului, deci de capacitatea lui de pătrundere în frunze; concentrația intracelulară maximă se atinge în cazul SDS 2%.

2. SDS în anumite concentrații crește cantitatea de apă și acizi nucleici liberi în frunzele de porumb tratate.

SDS 2% crește atît cantitatea de acizi nucleici — mai ales ARNs — cît și cantitatea de apă liberă.

SDS 1% și SDS 5% cresc cantitatea de apă liberă, dar nu și pe cea de acizi nucleici.

3. Creșterea cantității de apă liberă și acizi nucleici liberi sub acțiunea SDS se poate explica prin prizma teoriei biostructurii prin destrămarea biostructurii, după linii de clivaj specifice, și eliberarea corespunzătoare a unor componente.

Prezentat la redacție
20 februarie 1978

Institutul de Științe Biologice
Splaiul Independenței 296 77748
București

THE ACTION OF SODIUM DODECYLSULFATE ON THE NUCLEIC ACIDS IN MAIZE LEAVES

SUMMARY

Maize leaves immersed in SDS solutions of various concentrations release, when pressed, higher amounts of water and nucleic acids (particularly RNAs) than the leaves immersed in water. The effect depends on the intracellular concentration of the detergent, and it is highest at 2% SDS concentration. The reported experimental data are explained in the light of the biostructural theory of living matter.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. Cerc. Biochim., **12**, 19 (1969).
2. C. Rabega, R. Stănescu, în: *E. Macovschi, Natura și structura materiei vii*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1972, p. 81.
3. V. Elefterescu, St. Cerc. Biochim., **13**, 261 (1970).
4. E. Macovschi, F. Mosora, Rev. Roum. Biochim., **8**, 97 (1971).
5. F. Mosora, Rev. Roum. Biochim., **9**, 51 (1971).
6. C. Mușolan, St. Cerc. Biochim., **20**, 177 (1977).
7. C. Mușolan St. Cerc. Biochim., **13**, 301 (1970).
8. M. Ogur, G. Rosen, Arch. biochem., **25**, 262 (1950).
9. F. Solymossy, I. Fedorcsak, A. Gulyas, G. L. Farkas, L. Ehrenberg, Eur. Jour. Biochem., **5**, 520 (1968).
10. S. Vasu, Rev. Roum, Biochim., **6**, 75 (1969).
11. C. Mușolan, Teză de doctorat, București (1977).

ACŢIUNEA DODECILSULFATULUI DE SODIU ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI DIN FRUNZELE DE ORZ

CONSTANŢA MUŞOLAN

Rezumat. Frunzele de orz imersate în soluţii de SDS (1%, 2%, 5%) eliberează cantităţi de apă proporţionale cu concentraţiile detergentului în soluţiile de imersie. Cantitatea maximă de acizi nucleici se eliberează sub acţiunea SDS 1%. Speciile moleculare de acizi nucleici ce par să fie afectate de acţiunea detergentului sînt ADN, ARNs şi unele polinucleotide. Diferenţele între comportarea frunzelor de orz faţă de cea a frunzelor de porumb, cercetată într-o lucrare anterioară sînt interpretate pe baza teoriei biostructurale.

Teoria biostructurală afirmă că structura specifică materiei vii este biostructura, purtătoarea caracteristicilor viului. Răspunsul materiei vii la acţiunea diverşilor excitanţi sau la diferite tratamente se face prin intermediul biostructurii, iar specificitatea de specie, organism, organ, ţesut, a acestor răspunsuri se datoreşte particularităţilor biostructurii respective (1). În acest sens s-a arătat că răspunsul biostructurii la acţiunea căldurii depinde de specia de plantă tratată, definindu-se pentru fiecare o „temperatură letală minimă" (2) (3) (4) (5). Pe de altă parte s-a arătat că eterul, zăpada carbonică, sau azotul lichid determină eliberarea unor cantităţi diferite de zaharuri reducătoare din frunzele de varză, cineraria şi respectiv salată (6).

Pe baza celor de mai sus, este de aşteptat ca şi acţiunea detergenţilor asupra ţesuturilor vegetale să depindă de specia plantei tratate. Într-o lucrare anterioară am arătat că dodecilsulfatul de sodiu (SDS) 2% determină creşterea cantităţii de apă liberă şi acizi nucleici (mai ales ARNs) liberi din frunzele de porumb (7).

În lucrarea de faţă prezentăm datele obţinute într-o cercetare similară, efectuată pe frunze de orz, date ce se deosebesc de cele obţinute cu frunze de porumb, şi care s-ar putea explica prin specificitatea de specie a răspunsului ţesutului vegetal faţă de tratamentul cu SDS.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit frunze de orz în vîrstă de 8—10 zile. Tratamentul cu SDS, prelucrarea ulterioară a probelor, analiza cantitativă şi calitativă a acizilor nucleici s-a făcut după cum s-a descris într-o lucrare anterioară (7).

REZULTATE

Volumele de suc obținute din frunzele de orz tratate cu SDS 1%, 2% și 5% sînt date în tabela 1.

Tabela 1

Volumele de suc stors din 100 g frunze de orz tratate cu SDS 1%; 2%; 5%

Proba	Volum suc (ml)	Exces (% martor)
Martor	25	—
SDS 1%	37	48
SDS 2%	47	81
SDS 5%	50	100

Cantitățile și concentrațiile acizilor nucleici în aceste sucuri sînt date în tabela 2.

Diferența dintre dinamica eliberării apei și cea a eliberării acizilor nucleici din frunzele de orz tratate cu concentrații diferite de SDS este evidentă în reprezentarea grafică din figura 1. Se vede că în timp ce volumele sucurilor eliberate sînt oarecum proporționale cu concentrația SDS din soluția de imersie, cantitatea maximă de acizi nucleici se eliberează sub acțiunea SDS 1%, în timp ce SDS 2% și 5% determină eliberarea unor cantități mai mici, aproximativ egale din aceste componente.

Tabela 2

Cantitățile și concentrațiile AN storși din 100 g frunze de orz, tratate cu SDS 1%, 2% și 5%

Proba	Cantitatea AN (μg)			Concentrația AN (μg/ml)		
	ADN	ARN	AN	ADN	ARN	AN
Martor	125	500	625	5	20	25
SDS 1%	1221	1924	3145	33	52	85
SDN 2%	1128	1316	2444	24	28	52
ADS 5%	1100	1750	2850	22	35	57

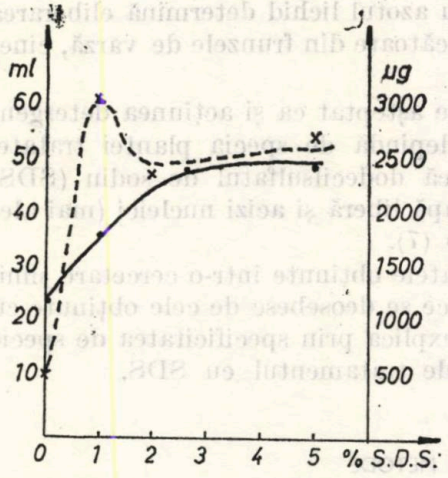


Fig. 1. — Volumele de suc (0) și cantitățile de AN(x) în probele stoarse din 100 g frunze de orz tratate cu SDS 1%, 2% și 5%.

Analiza calitativă a preparatului de acizi nucleici din sucul stors din frunzele de orz imersate în SDS 1% evidențiază unele deosebiri față de preparatul martor.

Astfel, curba de gel filtrare pe Biogel P.100 prezintă pe panta descendentă a piscului I un „umăr" II și o inflexiune III, ce pot reprezenta ARNs și fracții mai ușoare de polinucleotide (fig. 2).

Electroforetic, apar: fracția ADN, unele fracții de ARN înalt molecular, ARNs, o fracție nucleotidică mai mobilă decît ARNs și o fracție contaminantă, în cantitate foarte mică (fig. 3).

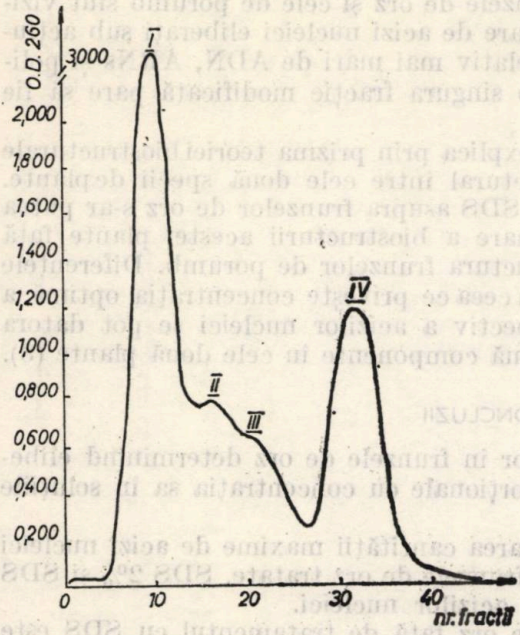


Fig. 2. — Gel-filtrarea pe Biogel P—100 a preparatului de AN din sucul stors din frunzele de orz tratate cu SDS 1%.

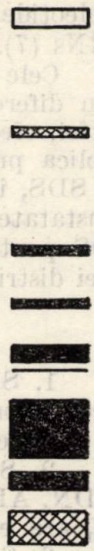


Fig. 3. — Electroforeza în agaroză a preparatului de AN din figura 2.

DISCUȚII

Cele de mai sus arată că SDS 1% provoacă eliberarea unei cantități apreciabile de apă (48% exces față de martor) din frunzele de orz, iar aceste cantități sînt încă și mai mari în cazul tratamentului cu SDS 2% (81%) și SDS 5% (100%). Aceasta arată că SDS pătrunde relativ ușor în frunzele de orz, iar concentrațiile sale intracelulare, a căror măsură poate fi dată de cantitățile de apă eliberate, sînt proporționale cu concentrația detergentului în soluțiile de imersie. Această comportare a frunzelor de orz este diferită de cea a frunzelor de porumb, în care SDS pătrunde mult mai greu, atingînd concentrații intracelulare care nu sînt proporționale cu concentrația sa în soluțiile de imersie. Astfel SDS 1% determină eliberarea unui exces de apă de numai 5%, iar pe de altă parte SDS 5%, datorită unei bariere de concentrație, eliberează un exces de numai 18%, față de 38% în cazul SDS 2% (7).

În cazul frunzelor de orz este foarte evidentă diferența între acțiunea detergentului asupra apei și cea asupra acizilor nucleici. Astfel, în timp ce cantitățile de apă eliberate sînt proporționale cu concentrația SDS în soluțiile de imersie, cantitatea cea mai mare de acizi nucleici este eliberată de SDS 1%. Așadar eliberarea acizilor nucleici nu este proporțională cu concentrația intracelulară a detergentului, ci depinde de o valoare optimă a acesteia. Și în această privință frunzele de orz se deosebesc de cele de porumb : la frunzele de orz concentrația SDS care determină eliberarea celei mai mari cantități de apă (SDS 5%) este diferită de cea care determină eliberarea celei mai mari cantități de acizi nucleici (SDS 1%) în timp ce la frunzele de porumb cantitatea maximă de apă ca și de acizi nucleici se obține la aceeași concentrație a detergentului (SDS 2%) (7).

Anumite diferențe între frunzele de orz și cele de porumb sînt vizibile și la nivelul speciilor moleculare de acizi nucleici eliberați sub acțiunea SDS : la orz apar cantități relativ mai mari de ADN, ARNs și polinucleotide, în timp ce la porumb singura fracție modificată pare să fie ARNs (7).

Cele de mai sus s-ar putea explica prin prizma teoriei biostructurale prin diferențele de ordin biostructural între cele două specii de plante. Astfel, efectele mai puternice ale SDS asupra frunzelor de orz s-ar putea explica printr-o labilitate mai mare a biostructurii acestei plante față de SDS, în comparație cu biostructura frunzelor de porumb. Diferențele constatate între orz și porumb în ceea ce privește concentrația optimă a SDS pentru eliberarea apei, respectiv a acizilor nucleici se pot datora unei distribuții diferite a celor două componente în cele două plante (8).

CONCLUZII

1. SDS pătrunde relativ ușor în frunzele de orz determinînd eliberarea unor cantități de apă proporționale cu concentrația sa în soluțiile de imersie.

2. SDS 1% provoacă eliberarea cantității maxime de acizi nucleici (ADN, ARN, polinucleotide) din frunzele de orz tratate. SDS 2% și SDS 5% are efecte mai slabe asupra acizilor nucleici.

3. Comportarea frunzelor de orz față de tratamentul cu SDS este diferită de cea a frunzelor de porumb, prezentată într-o lucrare anterioară (7) și poate fi explicată pe baza teoriei biostructurale, ținînd seama de particularitățile de specie ale biostructurii celor două plante.

Prezentat la redacție
23 februarie 1978

Institutul de Științe Biologice, Splaiul Independenței 296. Cod 77748 București România

THE ACTION OF SODIUM DODECYLSULFATE ON THE NUCLEIC ACIDS IN BARLEY LEAVES

SUMMARY

Barley leaves immersed in SDS solutions (1%; 2%; 5%) release amounts of water proportional to the detergent concentrations in the immersion solutions. The highest amount of nucleic acids is released by the treatment with 1% SDS. DNA, RNAs and some polinucleotides seem to be affected by the detergent treatment. The differences between the behavior of barley leaves, and that of maize leaves, investigated in a previous work, are given a possible explanation in the light of the biostructural theory.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Natura și structura materiei vii*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1972.
2. A. Mihăescu, St. cerc. biochim. **13**, 151 (1970).
3. A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 281 (1970).
4. A. Mihăescu, St. cerc. biochim. **14**, 57 (1971).
5. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
6. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. Roum. Biochim. **6**, 89 (1969).
7. C. Mușolan, St. cerc. biochim **21**, 183(1978).
8. C. Mușolan, *Teză de doctorat* București, 1977.

DETERMINAREA CONDUCTIVITĂŢII MOLARE A GELATINEI ÎN FUNCŢIE DE CONCENTRAŢIE ŞI TEMPERATURĂ

FLOARE ROTTENBERG

Rezumat. Conductivitatea molară a gelatinei este o mărime care ne permite să delimităm stările de agregare ale acesteia, ne dă indicaţii asupra modificării configuraţiei moleculei din ghem statistic în helix precum şi despre gradul de generalizare a gelificării. Cu ajutorul formulei $\alpha = \alpha_0 (1 - KT)$ se poate calcula temperatura de gelificare a gelatinei în funcţie de concentraţie.

Gelatina conţine în structura ei ioni de calciu, sodiu, potasiu, magneziu etc. În soluţiile de gelatină (solvent apa) s-au pus în evidenţă ioni de calciu sub formă liberă, hidrataţi şi mobili, aceştia fiind într-o concentraţie mai mare decît ceilalţi ioni [1]. Desprinderea ionilor din grupările funcţionale ale lanţului de aminoacizi se face datorită caracterului labil al legăturii [2].

Referitor la grupele ionice ale gelatinei [3] se pare că locurile libere de COO^- din gel sau soluţie depind de pH-ul acesteia, după cum protonarea grupelor amino depind de aceeaşi mărime.

Conductibilitatea ionică a gelatinei este deci determinată de ionii care se eliberează din structura acesteia.

MATERIAL ŞI METODĂ

Determinările au fost făcute cu gelatină comercială (M=60800), cu concentraţii cuprinse între 0,01—0,05 g/ml, în intervalul de temperatură 50°C pînă la cea de gelificare (T_g). Cu puntea „Universal" tip E—12 (clasă de precizie 1) s-a măsurat rezistenţa ohmică a soluţiei şi gelului de gelatină, frecvenţele fiind de 100 şi 1000 Hz.

Cu valorile lui R obţinute experimental, în funcţie de temperatură şi concentraţia gelatinei s-a calculat: rezistivitatea, conductivitatea şi conductivitatea molară a gelatinei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din rezultatele obţinute se constată că conductibilitatea molară a gelatinei scade cu creşterea concentraţiei [4] datorită faptului că eliberarea ionilor din structura gelatinei precum şi mobilitatea acestora este diminuată. Raportul între ionii fixaţi în structura gelatinei şi cei liberi depinzînd de concentraţie şi temperatură.

Modificarea conductivităţii molare (Λ) în funcţie de concentraţia gelatinei, pentru cîteva temperaturi este redată în figura 1. Se remarcă dependenţa lui Λ de C ca fiind complexă şi neliniară. Variaţia cea mai

mică a lui Λ în funcţie de temperatură se obţine pentru concentraţiile mari ale gelatinei, cea mai semnificativă pentru $C = 0{,}01$ g/ml.

Scăderea temperaturii produce, în final, gelificarea gelatinei, se formează o structură mai rigidă, dar organizată faţă de etapa de trecere (a soluţiei în gel), în acest fel este explicabilă scăderea de ordin valoric a conductivităţii molare (fig. 2).

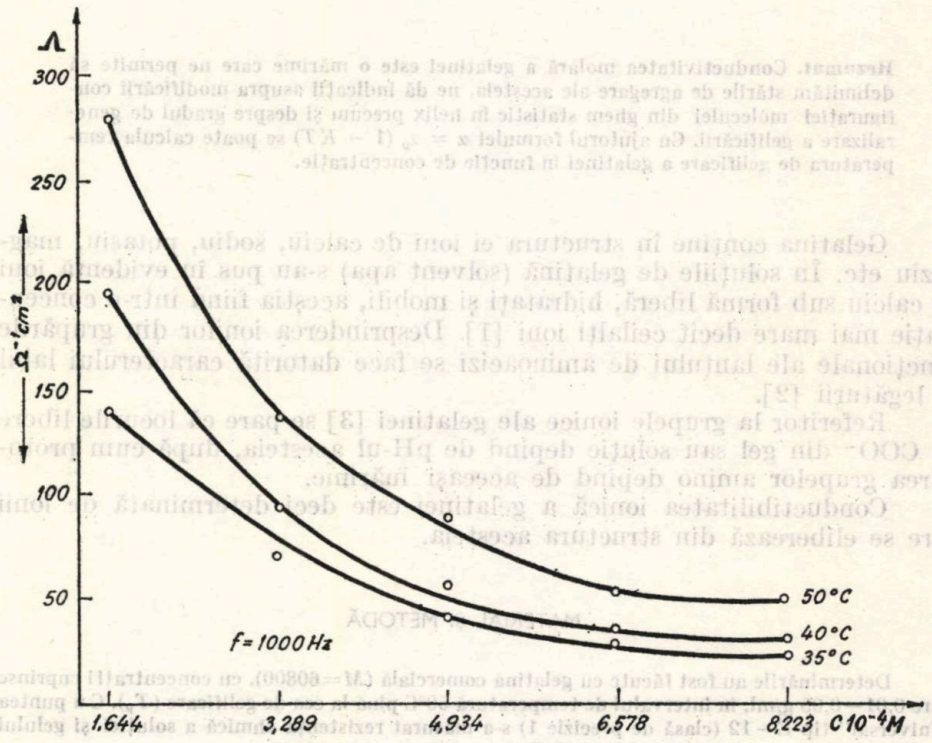


Fig. 1. — Variaţia conductivităţii molare a soluţiei de gelatină (starea lichidă) în funcţie de concentraţie.

Conductibilitatea molară ne permite să specificăm starea de agregare în care se găseşte gelatina, exemplul de mai jos este concludent:

$C_{\text{gelatină}} = 0{,}01$ g/ml

$t = 18°C$ $\Lambda = 48{,}13\ \Omega^{-1}\ cm^2$ (gel, starea solidă)

$t = 25°C$ $\Lambda = 85{,}62\ \Omega^{-1}\ cm^2$ (etapa de trecere)

$t = 50°C$ $\Lambda = 281{,}25\ \Omega^{-1}\ cm^2$ (starea lichidă)

La gel se poate deduce, cu ajutorul conductivităţii molare, gradul de generalizare a gelificării:

pentru $C_{\text{gelatină}} = 0{,}05$ g/ml; $T_g = 26°C$, de la această temperatură pînă la cea de 18°C se remarcă o scădere a lui Λ:

$t = 26°C$ $\Lambda = 13{,}17\ \Omega^{-1}\ cm^2$

$t = 25°C$ $\Lambda = 11{,}22\ \Omega^{-1}\ cm^2$

$t = 18°C$ $\Lambda = 7{,}43\ \Omega^{-1}\ cm^2$

Se remarcă o deviație procentuală de 43,584% a valorii lui la temperatura de 18°C față de cea de la 26°C, comparativ cu cea de la 50°C $\Delta\%$ este de 85,383.

Conform regulei lui Pisarjevski — Walden produsul $\Lambda\eta_0 = \text{const.}$ la soluțiile de electroliți, indiferent de temperatură [5].

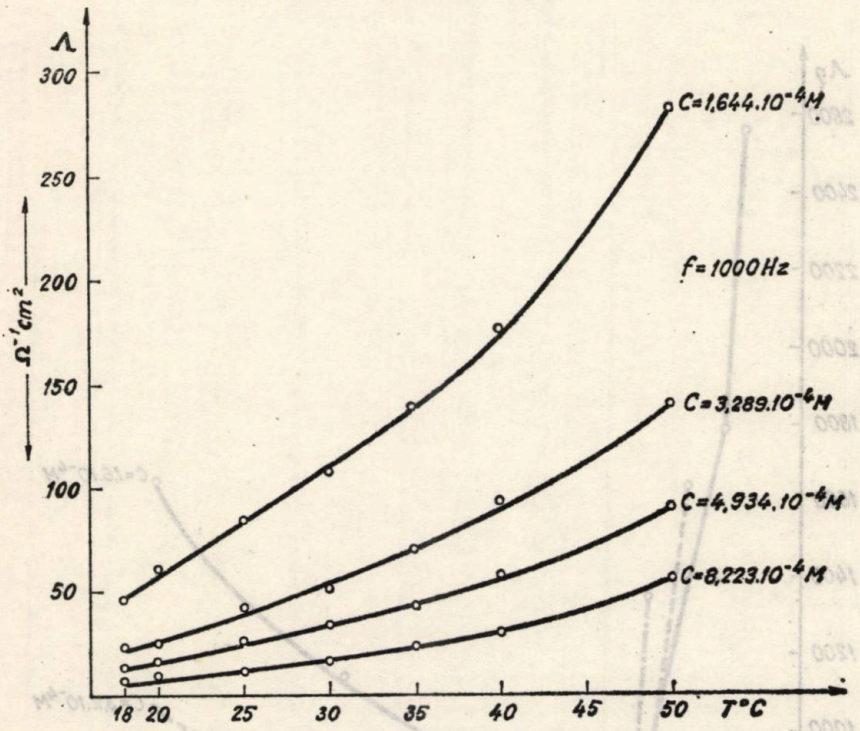


Fig. 2. — Modificarea conductivității molare a gelatinei în funcție de temperatură.

Păstrînd formal această lege, am înlocuit vîscozitatea solventului cu vîscozitatea gelatinei, pe care am determinat-o experimental cu ajutorul pendulului de torsiune [6], astfel că în relația :

$$\alpha = \Lambda\eta;$$

Λ — reprezintă conductibilitatea molară a gelatinei,

η — coeficientul de vîscozitate a soluției sau gelului de gelatină.

Din rezultatele obținute se remarcă variații semnificative ale lui α în funcție de temperatură și concentrația gelatinei (fig. 3). Valorile lui α la temperatura de gelificare (T_g) sînt așezate de așa manieră încît constituie o linie dreaptă, prin unirea punctelor. Panta liniei este descrescătoare, astfel încît legea empirică a dependenței lui α de T poate fi exprimată sub forma

$$\alpha = \alpha_0(1 - KT) \qquad (1)$$

în care : $\alpha_0 = \Lambda_0\eta_0$ (adică $C_{\text{gelatină}} \to 0$)

K — constantă.

Din extrapolarea valorilor lui α rezultă

$\alpha_0 = 8053$ iar din calcule se obține $K = 0{,}036$

Formula (1) se poate scrie

$$\alpha = 8053\,(1 - 0{,}036\ T)$$

Produsul $KT = 1$ și $\alpha = 0$ la temperatura de 27,778°C = T_c

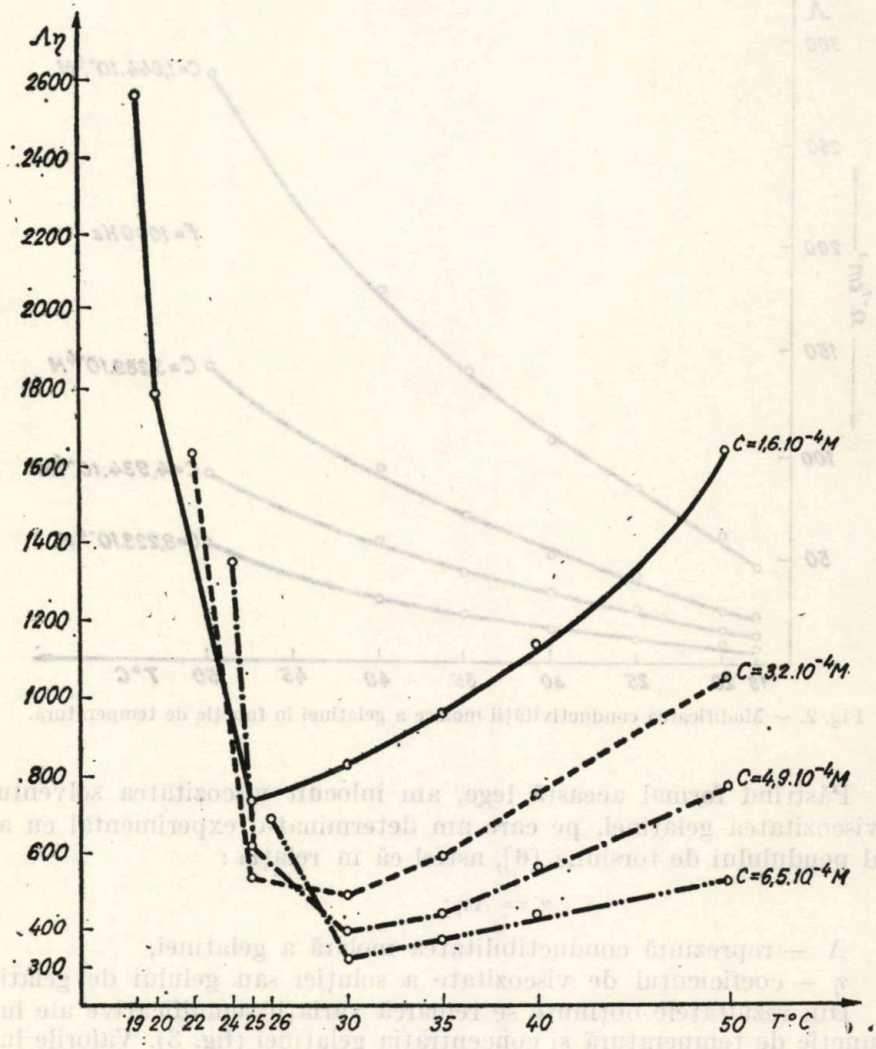


Fig. 3. — Modificarea lui α în funcție de temperatură și concentrația gelatinei.

T_c reprezintă temperatura critică, care delimitează starea lichidă a gelatinei de etapa de trecere spre cea de gel (solidă). Valoarea lui T obținută teoretic concordă cu datele experimentale.

CONCLUZII

1. Conductivitatea molară este o mărime ce delimitează cu o bună aproximație stările de agregare ale gelatinei.

2. După temperatura de gelificare a gelatinei Λ ne poate indica gradul de generalizare a gelificării.

3. α este o mărime dependentă de concentrație și temperatură. Cu relația (1) se poate calcula temperatura critică, la acele substanțe care se gelifică.

Prezentat la redacție la 6 decembrie 1977

Disciplina de biofizică
Institutul de Medicină Piața 23 August nr. 2
1900 Timișoara

DETERMINATION OF MOLAR CONDUCTIVITY OF GELATINE DEPENDING ON CONCENTRATION AND TEMPERATURE

SUMMARY

Molar conductivity of gelatine is a magnitude by which the states of aggregation of gelatine can be determined and information obtained on the transitions of the gelatine molecule pattern from the statistical ball into the helix configuration, as well as the degree of generalized gel formation.

By the aid of formula : $\alpha = \alpha_0(1 - KT)$, the temperature of gel formation of gelatine vs. concentration can be calculated.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Teitel, O. Chiculescu, Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., **33**, 301 (1974).
2 .N. Nuenke, J. Milgrom, J. Polymer Sci. A — **2**, 4, 158 (1966).
3. A. Veis, *The Macromolecular Chemistry of Gelatine*, Academic Press New York (1949).
4. G. Montande, P. Mararigna, P. Finocchiaro, C. G. Ovesberg, Macromol., **5**, 203 (1972).
5. T. Erdey-Gruz, G. Schay, *Chimie fizică teoretică*, vo. II, Ed. Tehnică București (1958).
6. Floare Rottenberg, teză de doctorat (1976).

REFERAT GENERAL

CROMATOGRAFIA DE AFINITATE PRINCIPII TEORETICE ŞI APLICAŢII PRACTICE*

HORTS D. SCHELL

INTRODUCERE

Metodele convenţionale de izolare şi purificare a proteinelor şi altor compuşi biologic activi se bazează în general pe diferenţele existente în proprietăţile fizico-chimice ale acestor compuşi, ca solubilitatea, încărcarea electrică, mărimea şi forma moleculelor, proprietăţi care nu sînt specifice.

Relativ recent a fost elaborată o nouă metodă de izolare şi purificare a acestor compuşi. Prin selectivitatea, eficienţa şi simplitatea ei, ea depăşeşte cu mult performanţele tuturor metodelor clasice folosite pînă în prezent în laboratoarele de biochimie analitică şi preparativă. Această metodă se bazează pe specificitatea interacţiunilor biologice ale biomoleculelor şi este cunoscută sub denumirea de *cromatografie de afinitate* sau *adsorbţie biospecifică* sau *bioselectivă*. Reacţia are loc, de regulă, între doi reactanţi — efectorul şi partenerul său afin — care se pot lega unul de celălalt în mod selectiv şi reversibil. Un exemplu clasic în acest sens îl oferă de pildă, formarea de complex dintr-o enzimă şi inhibitorul ei sau reacţia antigen-anticorp.

Prin legarea covalentă de un suport insolubil a unuia dintre cei doi parteneri de reacţie se obţine suportul afin pentru cromatografia de afinitate. Modul de acţiune al unui astfel de suport este reprezentat schematic în figura 1. Se încarcă o coloană cu suportul afin şi se aplică o soluţie apoasă (extract) a partenerului afin. Acesta va fi reţinut prin formarea de complex cu efectorul imobilizat, în timp ce tot restul de substanţe însoţitoare va trece nestingherit prin coloană. Coloana este apoi spălată pînă la îndepărtarea completă a substanţelor însoţitoare. Prin simpla modificare a mediului de eluţie (schimbarea pH-ului, a forţei ionice etc.), complexul format este descompus şi produsul dorit eluat în stare pură de pe coloană.

Reacţia care stă la baza cromatografiei de afinitate şi anume formarea de complex între efector şi partenerul său afin a fost descrisă deja în 1910 de Starkenstein (1) care semnalează adsorbţia selectivă a α-amilazei pe amidon insolubil. Cu 23 de ani mai tîrziu, Holmbergh (2) a sepa-

* Referat prezentat la Simpozionul-seminar cu tema *Metode moderne în cromatografia de lichide* organizat de Centrul de Chimie Fizică al M.I.Ch. în cooperare cu Fundaţia Europeană Scientific Exchange Agreement, 20—30 octombrie, 1976.

St. cerc. biochim., 21, 2, 199—217 (1978)

rat α- de β-amilază, pe baza intensității diferite cu care acestea sînt adsorbite de amidonul insolubil. Pînă la introducerea agarozei ca material de suport, în 1968, de către Cuatrecasas, Wilchek și Anfinsen (3), izolările de proteine biologic active pe baza cromatografiei de afinitate au fost puține la număr. Din această perioadă putem aminti, de pildă, lucrările cu privire la folosirea albuminei serice bovine, legată covalent de 4-amino-benzil-celuloză, pentru separarea și purificarea anti-albuminei serice bovine de iepure (4), apoi purificarea prin cromatografie de afinitate a tirozinazei pe fenol-celuloză (5), a flovakinazei pe flavin-celuloză (6), a enzimelor flavinmononucleotid-dependente pe flavinfosfat-celuloză (7).

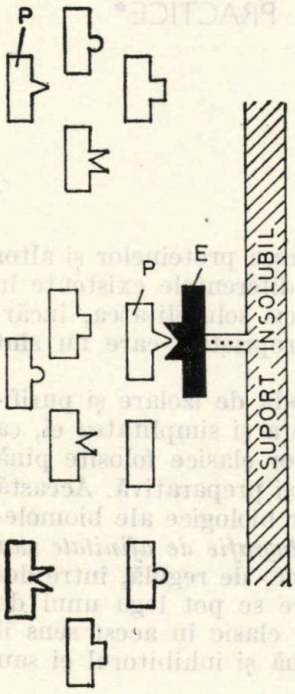


Fig. 1. — Reprezentarea schematică a modului de acțiune al cromatografiei de afinitate P = partener afin ; E = efector imobilizat.

Începînd însă cu anii 1968—1970 și pînă în prezent, în literatura de specialitate apare o adevărată avalanșă de lucrări consacrate aplicării cromatografiei de afinitate care ilustrează posibilitățile multiple și la început nebănuite ale acestei metode moderne, rapide și specifice pentru izolarea și purificarea celor mai diverse clase de substanțe biologic active (enzime, inhibitori naturali ai acestora, antigene, anticorpi, acizi nucleici, receptori specifici ai hormonilor, vitaminelor sau ai diferitelor medicamente etc.).

În ultimii ani, metoda a fost considerabil perfecționată prin faptul că efectorii nu mai sînt cuplați direct pe matricea suportului, ci prin intermediul unor brațe (spacer), fapt care anihilează în mare măsură împiedicările sterice existente uneori între efectorul legat și partenerul său afin (8).

Cele două componente principale în cromatografia de afinitate sînt reprezentate de suportul insolubil — care de obicei este un polimer organic, dar poate să fie și un produs anorganic, cum este sticla — și efectorul activ legat de acest suport.

SUPORTUL INSOLUBIL

Un suport ideal pentru cromatografia de afinitate trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

— să fie complet insolubil în apă, dar să aibă în același timp un pronunțat caracter hidrofil, adică să posede o capacitate bună de umectare și imbibiție ;

— să posede o rețea tridimensională suficient de laxă care să permită și moleculelor mai mari accesul nestingherit la efectorul imobilizat, situat și în interiorul rețelei tridimensionale a suportului ;

— să fie inert, adică să nu prezinte interacţiuni nespecifice cu substanţele ce urmează a fi separate, dar, mai ales, să nu posede funcţiuni schimbătoare de ioni;

— să fie chimic stabil faţă de diferitele condiţii de cuplare şi eluare, adică să reziste la un domeniu de pH cuprins între 2,0—12,0, la variaţii de forţă ionică şi la acţiunea unor denaturanţi cum sînt ureea, guanidina hidroclorică ş.a.;

— să dispună de grupări funcţionale care să permită legarea covalentă a efectorului, grupări care să fie suficiente ca număr şi situate de preferinţă la capătul unor braţe (catene, spacer) suficient de lungi pentru a evita — pe cît posibil — orice incomodare sterică între efector şi partenerul său afin;

— să posede proprietăţi mecanice bune, adică dimensiunea, forma şi gradul de compresiune al particulelor sale să permită — încărcate în coloane cromatografice — viteze bune de curgere, condiţii care sînt asigurate, de regulă, de un suport cu particule uniforme, de preferinţă sferice şi, în acelaşi timp, rigide.

Pînă în prezent nu s-a descris nici un suport care să îndeplinească în mod ideal toate aceste condiţii. Au fost elaborate, însă, o serie de suporturi, dintre care unele se apropie destul de mult de aceste cerinţe.

Astfel, deosebit de utile s-au dovedit ca suporturi insolubile pentru cromatografia de afinitate o serie de polimeri hidrofili ai polizaharidelor. Derivaţii dextranului legat încrucişat (Sephadex, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suedia) de pildă, posedă majoritatea proprietăţilor unui bun suport, enumerate mai sus, cu excepţia gradului de porozitate. Din acest motiv, derivaţii dextranului nu se recomandă ca suport pentru purificarea de enzime. Derivaţii agarozei, în schimb, un alt polimer polizaharidic, posedă aproape toate proprietăţile unui suport ideal (ex. Sephrarose 2B, 4B, 6B; AH-Sepharose 4B; CH-Sepharose 4B; BrCN-Sepharose 4B, toate de la firma Pharmacia Uppsala, sau biogelurile firmei BIO-RAD California). Din această categorie fac parte şi gelurile perlate de agaroză, cu sau fără braţe laterale, elaborate de H.D. Schell şi colab.(9). Gelurile perlate ale agarozei au o reţea deosebit de largă şi permit difuzia nestingherită, prin matricea gelului, chiar şi a unor molecule cu greutăţi moleculare ce depăşesc un milion.

Gelurile de poliacrilamidă posedă şi ele o serie din proprietăţile enumerate mai sus şi sînt oferite de firma Koch-Light, Anglia, ca „Enzacryl", în stare perlată cu dimensiuni şi porozităţi diferite. Porozitatea acestor geluri este însă inferioară celor de agaroză, dar prezintă avantajul că posedă un mare număr de grupări carbamilice ($-CONH_2$) susceptibile de transformări chimice în vederea legării efectorilor (10).

Rezultate bune ca suporturi insolubile dau şi derivaţii mai noi de sinteză ai celulozei (Merck, Darmstadt, R.F.G.), care sînt insolubili în apă, macroporoşi şi au o capacitate mare de cuplare (80 μmoli/ml) (11).

EFECTORUL

Efectorul ales pentru prepararea suportului afin necesar cromatografiei de afinitate trebuie să manifeste o afinitate selectivă pronunţată, dacă nu chiar exclusivă, faţă de molecula care urmează să fie izolată şi purificată.

Astfel, *în enzimologie* vor putea fi utilizaţi ca efectori : substrate, inhibitori, efectori allosterici, coenzime, reactivi specifici de grup, enzime ;
în imunologie :
haptene, antigene, anticorpi ;
în chimia acizilor nucleici :
acizi nucleici şi anumite fragmente constituţionale ale acestora, oligonucleotide, acidul 3-amino-benzen-boronic ;
în izolarea diferiţilor receptori proteici :
hormoni, vitamine, lectine (fitohemaglutinine).

Efectorii pot fi împărţiţi în două grupe mari : efectori cu o înaltă specificitate care formează complecşi doar cu un singur partener afin, şi efectori cu o specificitate mai largă (de grup), care pot forma complecşi cu mai mulţi parteneri.

Primului grup îi aparţin, spre exemplu : substrate de enzime, numeroşi inhibitori ai enzimelor, efectori allosterici, hormoni, vitamine, haptene, antigene şi anticorpi.

Celui de-al doilea grup îi aparţin spre exemplu : coenzimele, lectinele, reactivii specifici de grup (ex. p-aminofenil-mercuri-acetat).

CONDIŢIILE NECESARE PENTRU CUPLAREA EFECTORULUI DE SUPORTUL INSOLUBIL

Pentru a putea fi legat covalent de suportul insolubil efectorul trebuie să dispună în molecula sa de o funcţie chimică reactivă. Utile s-au dovedit, în acest scop, funcţiile aminice şi carboxilice. Dar şi funcţia hidroxilică şi cea sulfhidrică s-au dovedit avantajoase pentru realizarea unei legături covalente. Legătura trebuie să fie astfel realizată, încît centrul activ al efectorului să rămînă neblocat şi accesibil, iar condiţiile de cuplare să fie atît de blînde, încît efectorii macromoleculari să nu sufere denaturări.

Pentru a reduce, pe cît posibil, eventuale împiedicări sterice ce ar putea apare în cursul procesului de cromatografiere dintre efector şi partenerul afin la formarea complexului — mai ales în cazul interacţiunii unui efector cu greutate moleculară mică, cu un partener afin cu greutate moleculară ridicată — legarea efectorului de suportul insolubil va fi realizată, de preferinţă, prin intermediul unor braţe suficient de lungi.

TIPURI DE REACŢII FOLOSITE LA CUPLAREA EFECTORILOR DE SUPORTURI INSOLUBILE

În cele ce urmează vom da cîteva reacţii tipice de cuplare a efectorilor de suporturi insolubile, folosite în prezent pe scară largă şi cu rezultate deosebit de bune. Uneori, polimerii naturali sau de sinteză folosiţi ca suport trebuiesc activaţi însă înainte de a putea fi cuplaţi cu efectorii respectivi.

1. *Procedeu de cuplare cu azidă* (12) (13) 14). Suportul macromolecular insolubil (CM-celuloză, CM-agaroză) este activat mai întîi prin transformarea sa în azidă şi cuplat apoi cu efectorul.

$\equiv\!|-O-CH_2-COOH \xrightarrow[HCl]{CH_3OH} \equiv\!|-O-CH_2-COOCH_3$

carboximetil-derivat — ester metilic

$\equiv\!|-O-CH_2-COOCH_3 \xrightarrow{H_2N-NH_2} \equiv\!|-O-CH_2-CONH-NH_2$

hidrazidă

$\equiv\!|-O-CH_2-CONH-NH_2 \xrightarrow[HCl]{NaNO_2} \equiv\!|-O-CH_2-CON_3$

azidă

$\equiv\!|-O-CH_2-CON_3 + H_2N-\boxed{\text{EFECTOR}} \xrightarrow[8-9]{pH} \equiv\!|-O-CH_2-CO-NH-\boxed{\text{EFECTOR}}$

Această metodă se poate aplica şi gelurilor de poliacrilamidă:

$\equiv\!|-CONH_2 \xrightarrow{H_2N-NH_2} -CONH-NH_2 \xrightarrow[HCl]{NaNO_2} \equiv\!|-CON_3$

poliacrilamidă — hidrazidă — azidă

$\equiv\!|-CON_3 + H_2N-\boxed{\text{EFECTOR}} \rightarrow \equiv\!|-CO-NH-\boxed{\text{EFECTOR}}$

2. *Procedeu de cuplare cu folosirea carbodiimidelor* (15) (16). La această metodă efectorul poate fi legat covalent, printr-o legătură amidică, de suportul insolubil, fie prin grupările sale aminice libere, fie prin cele carboxilice libere, în funcţie de natura chimică a grupărilor active din molecula suportului insolubil folosit. Se pot folosi atît carbodiimide solubile, cum sînt 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă sau 1-ciclohexil-3(2--morfolinoetil)-carbodiimidă, cît şi insolubile, cum sînt N,N'-di-p-tolil-carbodiimidă sau diciclohexil-carbodiimidă. Carbodiimidele solubile au avantajul că la sfîrşitul reacţiei pot fi îndepărtate uşor din mediul de reacţie împreună cu produsele lor secundare de reacţie (derivaţi substituiţi ai ureei) care sînt şi ele solubile.

$\equiv\!|-O-CH_2-COOH + C(=N-R)(-N-R) \xrightarrow{H^+} \equiv\!|-O-CH_2-COOC(=N-R)(-NH-R)$

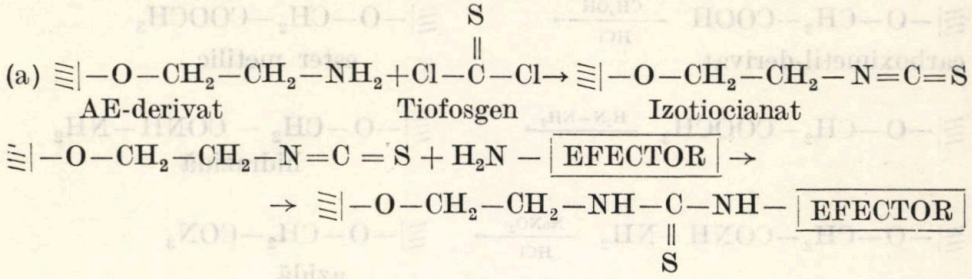
CM-derivat — Carbodiimidă — O-acil-izouree

$\equiv\!|-O-CH_2-COOC(=N-R)(-NH-R) \xrightarrow[pH\ 4-5]{H_2N-\boxed{\text{EFECTOR}}}$

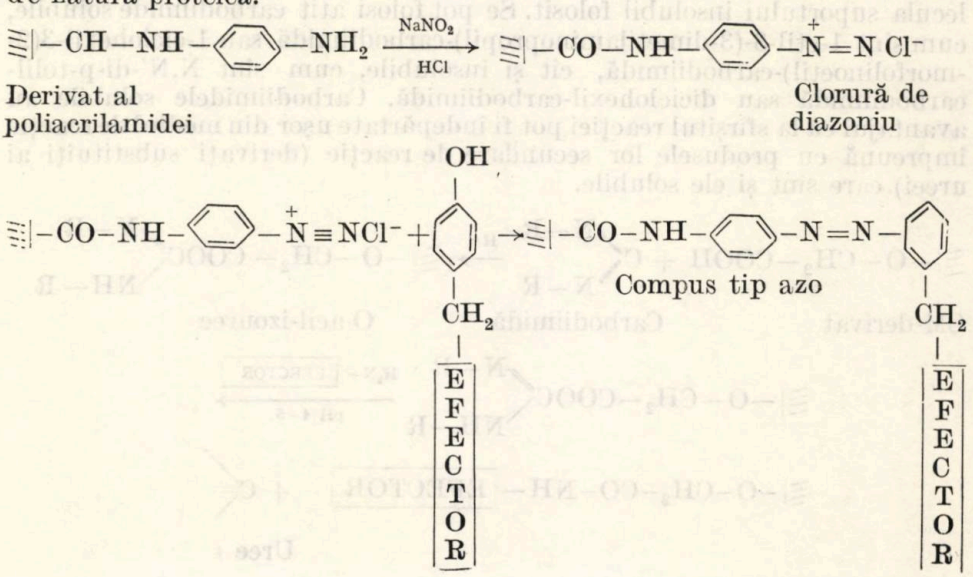
$\equiv\!|-O-CH_2-CO-NH-\boxed{\text{EFECTOR}} + C(=O)(-NH-R)$

Uree

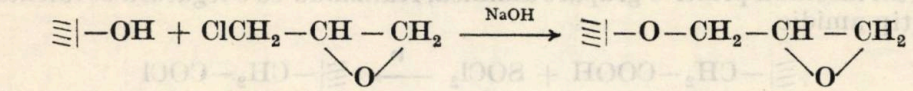
3. *Procedeu de cuplare cu izotiocianat sau izocianat* (17)—(19). Produsul final de reacţie este un derivat insolubil al tioureei (a) sau ureei (b). În comparaţie cu izotiocianaţii, izocianaţii prezintă dezavantajul că, în mediu apos, se hidrolizează mult mai repede decît cei dintîi.



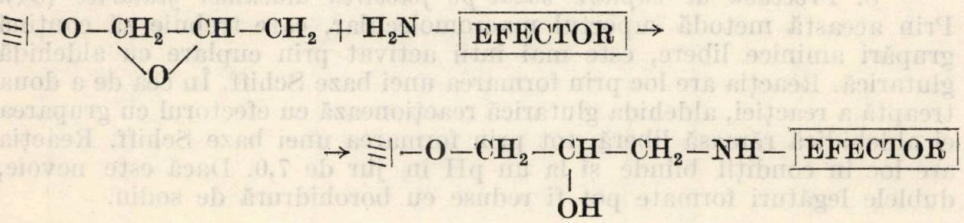
4. *Procedeu de cuplare prin formare de combinaţii de tip azo* (*diazotare*) (17) (20)—(26). Cuplarea se realizează, în acest caz, printr-o legătură tip azo dintre suport şi tirozina din molecula efectorului, dacă acesta este de natură proteică.



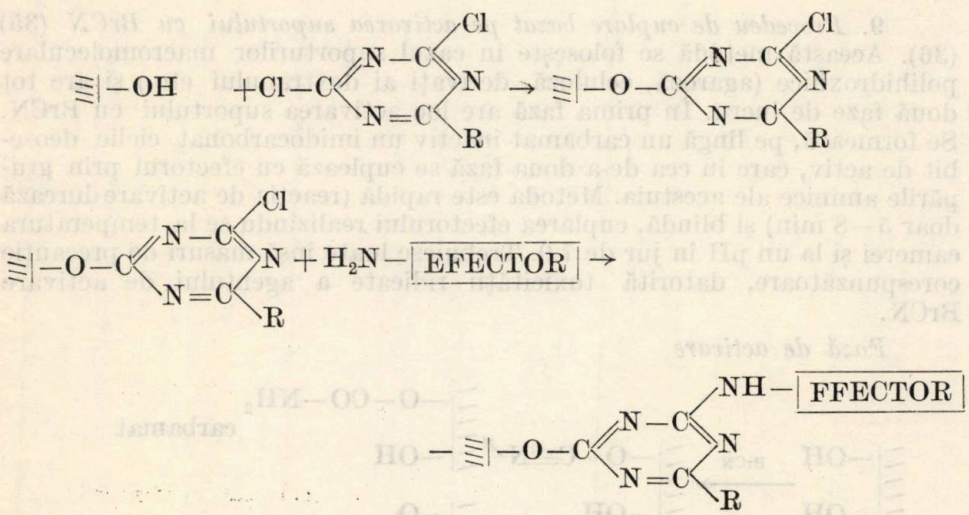
5. *Procedeu de cuplare pe suporturi de tip oxiran* (27). La acest procedeu macromolecula polizaharidică (de exemplu agaroza sau celuloza) este activată mai întîi prin tratare cu epiclorhidrină. Se formează un derivat de tip oxiran, capabil să cupleze efectorul prin gruparea sa aminică.



Compus macromolecular polihidroxilic — Epiclorhidrină — Derivat de tip oxiran

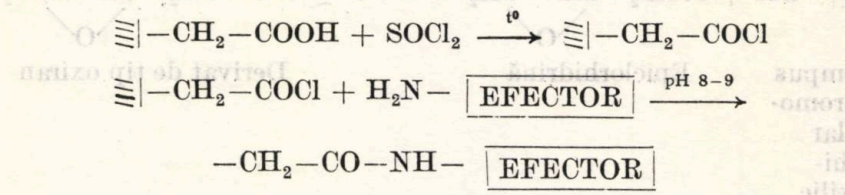


6. *Procedeu de cuplare a efectorilor de suporturi polihidroxilice activate cu derivați ai acidului cianuric* (28)—(32). Derivații acidului cianuric, cum sînt, de pildă, 2-amino-4,6-diclor-s-triazina sau 2,4,6-triclor-s-triazina, recționează ușor cu grupările hidroxilice din molecula suportului macromolecular insolubil. Produșii rezultați sînt foarte activi și leagă efectorul prin intermediu grupării sale aminice din moleculă.

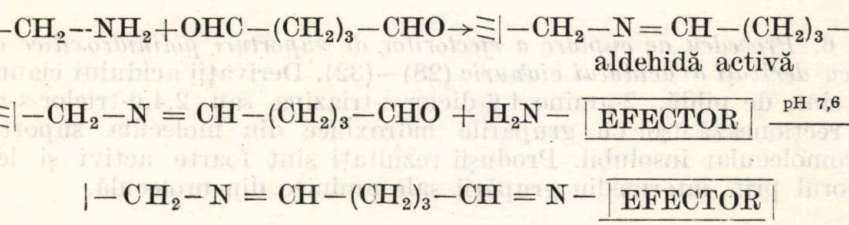


R = NH_2, Cl

7. *Procedeu de cuplare cu cloruri acide* (5) (33). La acest procedeu carboximetil-derivaţii polizaharidelor (CM-celuloză, CM-agaroză, etc.) se transformă mai întîi, prin încălzire cu clorură de tionil, în clorurile lor acide, care se folosesc apoi pentru cuplarea efectorului. Efectorul se leagă de suportul insolubil printr-o grupare aminică, realizîndu-se o legătură covalentă de tip amidic.

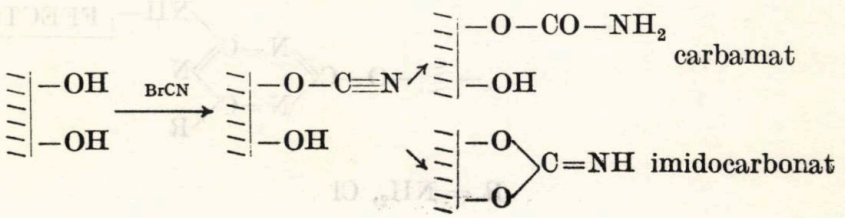


8. *Procedeu de cuplare bazat pe folosirea aldehidei glutarice* (34). Prin această metodă suportul macromolecular, care trebuie să conţină grupări aminice libere, este mai întîi activat prin cuplare cu aldehidă glutarică. Reacţia are loc prin formarea unei baze Schiff. În cea de a doua treaptă a reacţiei, aldehida glutarică reacţionează cu efectorul cu gruparea ei aldehidică rămasă liberă, tot prin formarea unei baze Schiff. Reacţia are loc în condiţii blînde şi la un pH în jur de 7,0. Dacă este nevoie, dublele legături formate pot fi reduse cu borohidrură de sodiu.

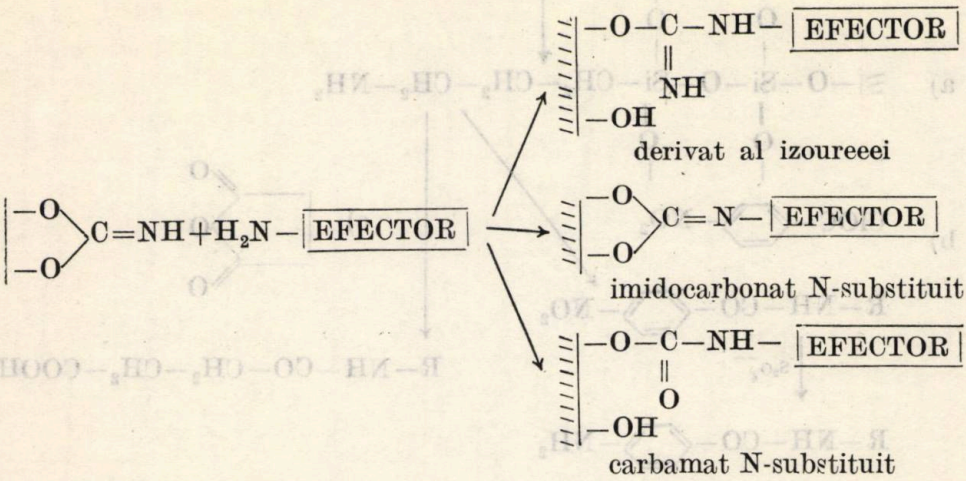


9. *Procedeu de cuplare bazat pe activarea suportului cu BrCN* (35) (36). Această metodă se foloseşte în cazul suporturilor macromoleculare polihidroxilice (agaroză, celuloză, derivaţi ai dextranului etc.) şi are tot două faze de lucru. În prima fază are loc activarea suportului cu BrCN. Se formează, pe lîngă un carbamat inactiv un imidocarbonat ciclic deosebit de activ, care în cea de-a doua fază se cuplează cu efectorul prin grupările aminice ale acestuia. Metoda este rapidă (reacţia de activare durează doar 5—8 min) şi blîndă, cuplarea efectorului realizîndu-se la temperatura camerei şi la un pH în jur de 7.0. Trebuiesc luate însă măsuri de precauţie corespunzătoare, datorită toxicităţii ridicate a agentului de activare BrCN.

Fază de activare



Fază de cuplare

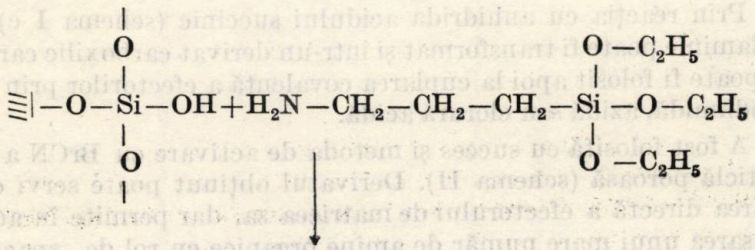


10. *Cuplarea efectorilor de suporturi anorganice* (37)—(41). În ultimul timp au fost elaborate şi procedee de cuplare a efectorilor de suporturi anorganice, cum sînt sticla sau chiar oţelul inoxidabil. S-a putut observa, cu această ocazie, că enzimele legate de aceste suporturi anorganice pot prezenta chiar o serie de avantaje faţă de cele legate de suporturi macromoleculare organice. Ele au, între altele, o mai mare stabilitate, sînt mai puţin sensibile la variaţii de pH şi la acţiunea solvenţilor, nu-şi modifică dimensiunea şi forma la presiuni mai înalte şi nu sînt atacate de microorganisme.

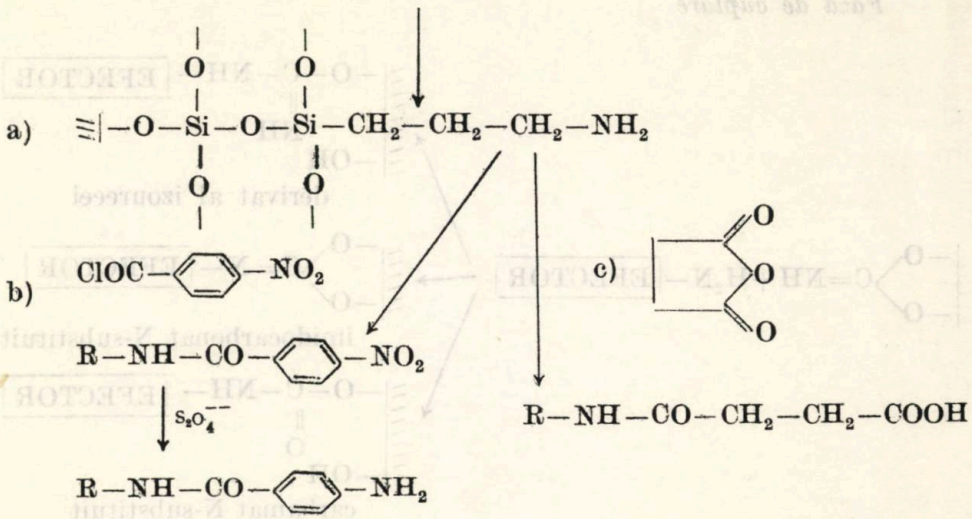
Cercetările efectuate în laboratoarele firmei Corning Glass au dus la obţinerea unor suporturi de sticlă poroasă cu o dimensiune a porilor între 70—2300 Å. Dimensiunea particolelor sferice (perle) poate varia între 18 pînă la 400 mesh (40—840 μ). Suprafaţa prezentată de aceste perle poate depăşi chiar 100 m^2/g.

Pentru legarea covalentă a efectorilor de un suport anorganic, cum este sticla, aceasta este mai întîi activată cu un silan organic care se leagă de suprafaţa ei şi o face capabilă să reacţioneze, în continuare, cu efectori din cele mai diferite clase de substanţe organice. Reacţiile care au loc sînt prezentate în schemele de mai jos :

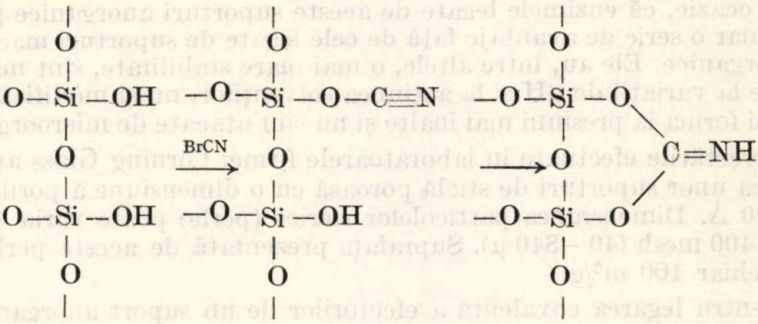
Schema I



a)



Schema II



Derivatul alchilaminic rezultat (schema I a) poate fi folosit ca atare, pentru legarea covalentă a efectorilor, printr-o mare varietate de metode amintite mai sus (carbodiimidă, izocianat, izotilcianat, glutaraldehidă etc.) sau poate fi transformat în derivatul său arilaminic (schema I b) care, la rîndul său, poate fi diazotat și cuplat prin legături azo cu efectorul dorit.

Prin reacția cu anhidrida acidului succinic (schema I c), derivatul alchilaminic poate fi transformat și într-un derivat carboxilic care, la rîndul său, poate fi folosit apoi la cuplarea covalentă a efectorilor prin metoda cu carbodiimidă, azidă sau clorură acidă.

A fost folosită cu succes și metoda de activare cu BrCN a suportului din sticlă poroasă (schema II). Derivatul obținut poate servi ca atare la cuplarea directă a efectorului de matricea sa, dar permite în același timp și atașarea unui mare număr de amine organice cu rol de „spacer".

FACTORI CE INFLUENȚEAZĂ PROCESUL CROMATOGRAFIEI DE AFINITATE

Factorul care influențează cel mai mult procesul propriu-zis al cromatografiei de afinitate este gradul de intensitate al interacțiunii dintre efectorul legat și partenerul său afin. Drept criteriu de stabilitate al complexului format poate fi luată constanta sa de disociere (K) :

$$K = \frac{[E][P]}{[EP]}$$

unde E, P și EP reprezintă efectorul, respectiv partenerul afin și complexul.

Influența constantei de disociere K asupra desfășurării procesului de cromatografie este ilustrată în fig. 2, (42). Dacă valoarea acestei constante este scăzută ($K < 10^{-5}$ M) partenerul afin rămîne puternic fixat de efector (fig. 2 A) și poate fi eluat numai prin modificări mai drastice ale mediului de cromatografiere, de pildă, prin creșterea concentrației ionice, prin mărirea sau micșorarea pH-ului, prin folosirea de soluții relativ concentrate de efectori sau prin folosirea unor agenți slabi de denaturare (uree, guanidină hidroclorică). Eluția prin folosirea unei soluții de efector, care se bazează pe o desprindere competitivă a partenerului afin de pe suportul afin, este deosebit de blîndă și prezintă, totodată, și avatanjul unei protejări accentuate a moleculei eluate față de denaturări (cazul enzimelor). Sînt, însă, și cazuri cînd aplicarea doar a unuia dintre procedeele de eluție amintite nu duce la desprinderea partenerului afin de pe suportul din coloana cromatografică. În acest caz se va folosi o combinare convenabilă între posibilitățile de eluție amintite. În sfîrșit, în cazuri extreme se pot întîlni și situații în care complexul format nu se mai poate desface.

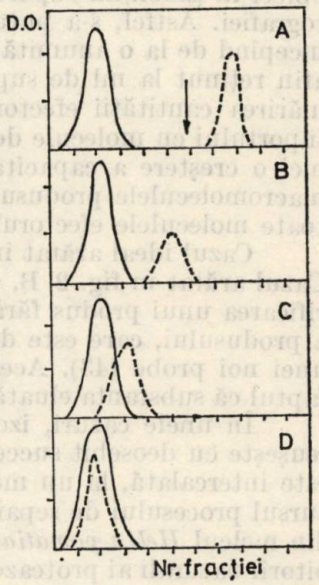


Fig. 2. — Posibilități de desfășurare a cromatografiei de afinitate
– – – – produsul ce urmează a fi separat;
——— proteinele însoțitoare

Pe măsură ce valorile constantei de disociere K cresc, partenerul afin este din ce în ce mai puțin intens fixat și, la un moment dat, doar întîrziat la trecerea sa prin coloană. Fig. 2 B corespunde desfășurării unei cromatografii de afinitate la valori ale constantei K cuprinse între 10^{-4}—10^{-3} M. În aceste condiții partenerul afin este încă în așa măsură întîrziat, încît el mai poate fi separat fără greutate, prin cromatografie de afinitate, de substanțele ce-l însoțesc.

Fig. 2 C arată cazul în care interacțiunea dintre cei doi parteneri este atît de slabă încît separarea este doar schițată. În fig. 2D, în sfîrșit, nu se mai poate constata nici un fel de interacțiune.

Desfăşurarea cromatografiei de afinitate mai este influenţată şi de o serie de alţi factori, ca de pildă :

— forţa ionică şi valoarea pH-ului tamponului iniţial de lucru ;
— gradul de puritate şi concentraţia partenerului afin ;
— densitatea efectorului grefat pe suportul insolubil.

În ceea ce priveşte forţa ionică şi pH-ul tamponului iniţial de lucru, se poate observa uneori faptul că în anumite soluţii tampon produsul de purificat nu este reţinut de suportul afin. În acest caz se recomandă modificarea parametrilor soluţiei tampon sau chiar înlocuirea acesteia. Gradul de puritate şi concentraţia produsului ce urmează a fi izolat şi purificat în cromatografia de afinitate pot juca de asemenea un rol important, mai ales în acele cazuri, cînd interacţiunea dintre parteneri este slabă şi ajunge doar pentru o întîrziere a partenerului afin (fig. 2 B). În acest caz se recomandă o purificare prealabilă prin metode uzuale (ex. precipitare fracţionată cu sulfat de amoniu).

Cantitatea efectorului cuplat de suportul insolubil, exprimată de obicei în μmoli/ml suport, influenţează de asemenea desfăşurarea cromatografiei. Astfel, s-a putut observa că suportul afin devine activ numai începînd de la o anumită cantitate de efector legat. Cantitatea de partener afin reţinut la ml de suport afin, exprimată în mg sau μmoli, creşte cu mărirea cantităţii efectorului cuplat de suport. O încărcare excesivă a suportului cu molecule de efector nu mai duce însă, la un moment dat, la nici o creştere a capacităţii de fixare, deoarece, din motive pur sterice, macromoleculele produsului de purificat nu mai reuşesc să acţioneze cu toate moleculele efectorului legat de suport.

Cazul ideal arătat în fig. 2 A nu este întotdeauna şi cel mai practic. Cazul arătat în fig. 2 B, spre exemplu, prezintă avantajul că permite purificarea unui produs fără schimbarea tamponului. După eluţia completă a produsului, care este doar întîrziat, coloana este gaza pentru aplicarea unei noi probe (43). Acest procedeu prezintă însă un inconvenient prin faptul că substanţa eluată este relativ diluată.

În unele cazuri, izolarea anumitor biomolecule din extracte brute reuşeşte cu deosebit succes doar atunci cînd cromatografia de afinitate este intercalată, la un moment dat, printre procedeele clasice folosite în cursul procesului de separare. Aşa s-a fracţionat, de pildă, extractul brut din melcul *Helix pomatia*, mai întîi cu sulfat de amoniu, înainte ca inhibitorii naturali ai proteazelor existente în extract să fi fost izolate prin cromatografie de afinitate pe celuloză cuplată cu tripsină. Amestecul de inhibitori eluaţi de pe coloană a fost apoi supus gel-filtrării şi cromatografiei de schimb ionic, pentru separarea fiecărui inhibitor în parte (44).

Acest exemplu arată că în anumite cazuri cromatografia de afinitate nu înlocuieşte în mod definitiv metodele uzuale de separare şi purificare ale biomoleculelor, şi că numai o combinare judicioasă a metodelor devenite clasice, cu cea nouă, duce la rezultatele aşteptate.

DOMENII DE APLICARE A CROMATOGRAFIEI DE AFINITATE

Cromatografia de afinitate îşi găseşte o nebănuit de vastă aplicare mai ales în două dintre cele mai importante domenii ale biochimiei şi medicinei, cum sînt domeniul proteinelor — care cuprinde mai cu seamă enzimologia şi imunologia — şi domeniul acizilor nucleici.

În cele ce urmează ne vom referi, din marele număr de lucrări apărute în aceste domenii, doar la lucrările mai recente, şi, totodată, mai reprezentative pentru domeniile aminitite.

ENZIMOLOGIE

Izolarea şi purificarea de enzime. Cele mai multe exemple de aplicare a cromatografiei de afinitate descrise pînă în prezent se referă la izolări şi purificări de enzime. Drept efectori s-au folosit în aceste cazuri mai ales inhibitori naturali sau de sinteză, cu greutăţi moleculare mai mici sau mai mari, substrate, coenzime, efectori alosterici şi reactivi cu specificitate de grup.

Cel mai des s-a utilizat inhibitori cu greutăţi moleculare joase, ca în lucrarea cunoscută a lui Cuatrecasas, Wilchek şi Anfinsen (3), în care s-a descris purificarea prin cromatografie de afinitate a carboxipeptidazei A, a α-chimotripsinei şi a nucleazei stafilococice. Cu agaroza, autorii au folosit pentru prima dată un suport care îndeplinea în mare măsură cerinţele unui suport ideal.

Şi suporturile mai noi, pe bază de celuloză, îndeplinesc în bună parte aceste condiţii. Unul dintre primele exemple de aplicare a derivaţilor de sinteză ai celulozei îl constituie folosirea aminododecil-celulozei succinilate, cuplată cu 4-amino-benzamidină, la purificarea tripsinei (45), 4-amino-benzamidina fiind un inhibitor cu greutate moleculară mică al proteazelor de tipul tripsinei. Pentru eluţie, pH-ul tamponului a fost coborît la 2,0, procedeu foarte frecvent folosit în cromatografia de afinitate, pentru desprinderea de pe suport a partenerului afin. Coloana a fost refolosită de 19 ori, fără ca suportul să-şi micşoreze capacitatea sa (30 mg proteină/ml suport). Tripsina a fost purificată şi prin cromatografie pe 4-amino-benzamidin-agaroză. Pentru izolarea tripsinei s-au folosit şi inhibitori naturali, de exemplu ovomucoidul (46) (fig. 3).

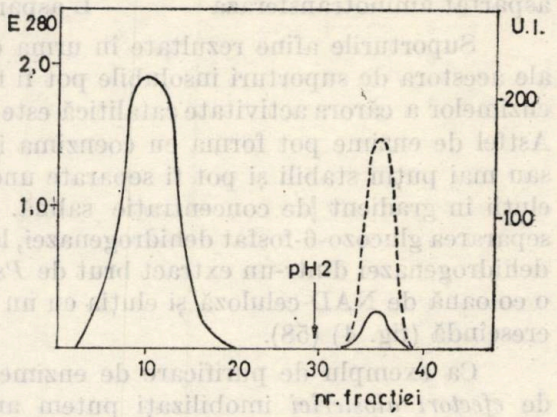


Fig. 3. — Izolarea prin cromatografie de afinitate a tripsinei pe ovoinhibitor imobilizat pe CM-agaroză

Inhibitorul de tripsină al lui Kunitz, din soia (GM = = 22 000) a fost şi el fixat de un derivat al celulozei, aminohexil-celuloza, şi folosit la purificarea Kalikreinei din ser uman şi de porc (47). În acest caz eluţia nu a putut fi realizată prin scăderea pH-ului întrucît Kalikreina s-ar fi denaturat în mediu acid. De aceea, s-a folosit drept eluant o soluţie neutră de uree sau una slab alcalină de benzamidină. Prin această metodă Kalikreina din serul uman a putut fi îmbogăţită de 350 de ori, iar suportul afin a putut fi folosit de 30 de ori fără să-şi piardă din afinitatea sa.

Alte exemple de purificare a proteazelor prin folosirea de inhibitori imobilizaţi sînt : izolarea de proteaze microbiene cu acetil-D-fenil-alanil-agaroză (48), cu glicil-L-leucil-agaroză (49) şi cu ovoinhibitor cuplat de suport (50), precum şi purificarea reninei cu pepstatină imobilizată (51) (52), un inhibitor al proteazelor de origine microbiană.

Dintre lucrările mai recente cu privire la izolarea prin cromatografie de afinitate a unor enzime implicate în metabolismul acizilor nucleici putem aminti : izolarea de ribonuclează pancreatică bovină (53) şi de porc (54) pe agaroză cuplată cu un inhibitor de greutate moleculară joasă, de genul 5′-(4-aminofenil-fosforil)-uridin-2′, 3′-ciclofosfatului, izolarea de ribonucleotid-reductază (55), timidin-kinază (56) şi timidil-sintetază (57) pe derivaţi nucleotidici imobilizaţi.

Folosirea de *substrate* imobilizate la purificarea enzimelor prin cromatografie de afinitate se întîlneşte mai puţin frecvent. În majoritatea cazurilor au fost purificate pe această cale enzimele implicate în metabolismul glucidic. Ca exemple putem aminti :

Enzima purificată;	*Suportul insolubil folosit;*
α-amilază	glicogen
α-galactozidază	4-aminofenol-melibiozid
β-glucozidază	4-amino-β-D-galactopiranozid
lizozim	chitină
penicilinază	cefalosporin-C-agaroză
colagenază	colagen-agaroză
ATP-ază	ATP-agaroză
fosfataze	fenilfosfat-agaroză
aspartat aminotransferază	L-aspartat-α-cetoglutarat-agaroză

Suporturile afine rezultate în urma cuplării de *coenzime* sau *analogi* ale acestora de suporturi insolubile pot fi folosite la izolarea şi purificarea enzimelor a cărora activitate catalitică este dependentă de aceste coenzime. Astfel de enzime pot forma cu coenzima imobilizată complecşi mai mult sau mai puţin stabili şi pot fi separate unele de altele prin aplicarea unei eluţii în gradient de concentraţie salină. Prin acest procedeu a reuşit separarea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, lactat dehidrogenazei şi a treonin dehidrogenazei dintr-un extract brut de *Ps. oxalicus* prin trecerea sa peste o coloană de NAD-celuloză şi eluţia cu un tampon fosfat de concentraţie crescîndă (fig. 4) (58).

Ca exemplu de purificare de enzime reglate alosteric prin folosirea de *efectori alosterici* imobilizaţi putem aminti cazul chorismat mutazei (L-triptofan-agaroză) (59) şi al treonin deaminazei (60) (61).

Pot fi folosiţi ca efectori în obţinerea suportului afin, în sfîrşit, şi *reactivi specifici de grup*. Astfel pentru purificarea proteinelor-SH s-au dovedit foarte utile substanţele ca 4-aminomercuri-acetatul, cisteina şi glutationul. Prin acest procedeu s-a putut purifica papaina (62) (63) şi catepsina B_1 (64).

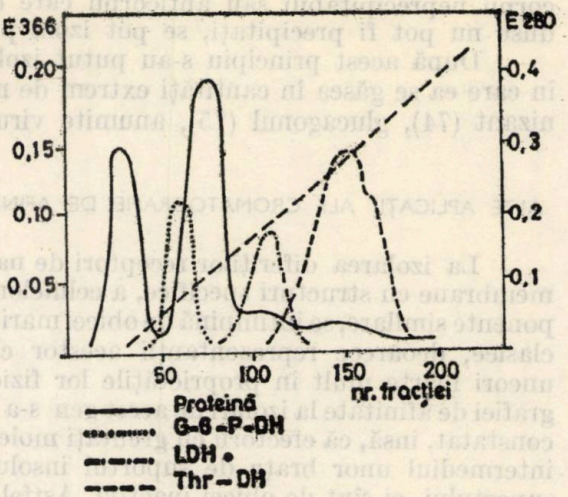


Fig. 4. — Diagrama de separare a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, lactat dehidrogenazei și treonin dehidrogenazei prin cromatografie de afinitate pe NAD-celuloză.

IZOLAREA ȘI PURIFICARE DE INHIBITORI AI ENZIMELOR

Enzimele fixate covalent de suporturi insolubile pot fi folosite, la rîndul lor, și ca suporturi afine în cromatografia de afinitate, pentru izolarea inhibitorilor lor naturali.

Prin această metodă au fost izolate mai ales o serie de inhibitori ai proteazelor. Astfel, s-au putut obține inhibitorii acidorezstenți ai proteazelor, prin cromatografia de afinitate a plasmei sangvine umane sau a secreției bronhice, pe un suport afin rezultat din cuplarea tripsinei bovine de CM-celuloză (65) (66). Inhibitorii au fost adsorbiți la rece (0—4°C) de tripsină imobilizată, la un pH 7,8, în sistem „bach", apoi spălați și centrifugați de mai multe ori cu tampon trietanolamină-HCl 0,2 M, pH 7,8, și suspendați în cele din urmă într-o soluție de KCl 0,3 M. Prin aducerea pH-ului la 2,0 inhibitorii sînt desorbiți de pe suportul insolubil și separați de acesta prin simplă filtrare sau centrifugare.

În mod analog s-a putut izola α_1-antitripsină din serul uman cu ajutorul aceluiași suport afin (67). Ovomucoidul (68) și inhibitorul tripsinei din ovare de bovină (69) au fost izolate cu ajutorul tripsinei legate de Sephadex-G-200 sau de agaroză, inhibitorul chimotripsinei din cartof cu ajutorul chimotripsinei cuplate de hidroxialchilmetacrilat polimerizat (70), inhibitorul dezoxiribonucleazei I din timus de vițel cu DNA-ază legată de agaroză (71), iar inhibitorul nucleazei din ficat de șobolan prin cromatografie de afinitate pe un suport afin rezultat din legarea covalentă a ribonucleazei de CM-celuloză (72).

IMUNOLOGIE

Antigenele și haptenele cuplate de suporturi insolubile pot fi folosite cu succes la izolarea anticorpilor complimentari, iar anticorpii fixați de aceste suporturi, la izolarea antigenelor complimentari. Chiar și anti-

corpii neprecipitabili sau anticorpii care din cauza concentrației lor reduse nu pot fi precipitați, se pot izola prin cromatografie de afinitate.

După acest principiu s-au putut izola, de pildă, insulina din seruri în care ea se găsea în cantități extrem de mici (73), apoi hormonul luteinizant (74), glucagonul (75), anumite virusuri (76) etc.

ALTE APLICAȚII ALE CROMATOGRAFIEI DE AFINITATE ÎN DOMENIUL PROTEINELOR

La izolarea diferiților receptori de natură proteică, a fracțiunilor de membrane cu structuri specifice, a celulelor imuno-specifice și a altor componente similare, se întîmpină de obicei mari dificultăți la folosirea metodelor clasice, deoarece reprezentanții acestor clase de compuși se aseamănă uneori foarte mult în proprietățile lor fizico-chimice. Aplicarea cromatografiei de afinitate la izolări de acest gen s-a dovedit deosebit de utilă. S-a constatat, însă, că efectorii cu greutăți moleculare mici trebuiesc fixați prin intermediul unor brațe de suportul insolubil. Fixați direct de matricea suportului, ei sînt de obicei inactivi. Astfel, în timp ce receptorul insulinei din celule de ficat a putut fi îmbogățit, într-un extract cu Triton, prin metode clasice laborioase (precipitare cu sulfat de amoniu, cromatografia pe DEAE-celuloză etc.), doar de aproximativ 60 ori, prin folosirea cromatografiei de afinitate pe un suport de insulină imobilizată pe agaroză el a putut fi îmbogățit într-un singur pas, de 800 ori (77).

În mod similar s-au izolat și receptorii glucagonului, din membrane, celulare ale ficatului, pe glucagon-agaroză (78), receptorii estradiolului, din uter de vițel pe 17-β-estradiol-17-hemisuccinat-agaroză (79), receptorul din membrana *B. subtilis*, care leagă penicilina, pe un suport rezultat din cuplarea acidului 6-amino-penicilanic de agaroză (80), proteina β-receptorului din mușchiul cardiac de cîine, pe noradrenalină-agaroză (81), proteina din granulocite ce leagă vitamina B_{12} și factorul intrinsic din sucul gastric, pe vitamina B_{12}-agaroză (82) (83), receptorii acetilcolinei din oraganul electric de la *Electrophorus electricus*, pe inhibitorii imobilizați ai acetilcolinei (84), care au putut fi folosiți și pentru izolarea acetilcolinesterazei (85) etc.

Lectinele (fitohemaglutinine) și alte tipuri de aglutinine prezintă o specificitate gen anticorp față de glicoproteine și polizaharide. Concanavalina A, de pildă, este specifică pentru aceste macromolecule mai ales cînd ele dispun de un rest terminal α-D-manopiranozic (86).

Concanavalina A imobilizată a fost folosită, între altele, la izolarea de : fitohemaglutinine (lectine) din leguminoase (87), α-fetoproteină (88), receptori glicoproteici din membrane de limfociți (89), glicoproteine virale (90) etc.

La rîndul lor, lectinele și alte tipuri de hemaglutinine pot fi separate și ele prin cromatografia de afinitate, folosind de data aceasta suporturi afine rezultate în urma mobilizării unor derivați ai hidraților de carbon. Astfel, s-a izolat : lectina din soia pe α-D-galactopiranosilamin-agaroză (91), lectina din germeni de grîu pe N-acetil-glucozamină imobilizată (92), hemaglutinina din *Pseudomonas aeruginosa* pe agaroza ca atare (93).

Întrucît *celulele* posedă pe suprafețele lor anumite funcțiuni organice cu ajutorul cărora pot interacționa cu efectori biologic activi (hormoni,

antigene), ele pot fi de asemenea izolate selectiv prin cromatografia de afinitate.

Astfel, s-a descris izolarea de celule adipoase pe insulină-agaroză (94), timocite și eritrocite pe Concanavalina-A-agaroză (95), limfocite pe haptene sau antigene imobilizate (96) etc.

Suporturile folosite la imobilizarea efectorilor au fost : țesătură de nylon, perle de sticlă, poliacrilamidă, celuloză, agaroză și altele.

FOLOSIREA CROMATOGRAFIEI DE AFINITATE ÎN DOMENIUL ACIZILOR NUCLEICI

Izolările și purificările prin cromatografie de afinitate în domeniul acizilor nucleici se bazează, de regulă, pe interacțiunea specifică dintre acizii dezoxiribonucleici și acizii ribonucleici, cunoscută sub denumirea de hibridizare, fenomen care se întîlnește și la frgmentele și componentele constituționale ale acizilor nucleici.

Ca exemple de aplicare a cromatografiei de afinitate în acest domeniu putem aminti, de pildă, izolarea ARN-tip T_4 pe ADN-T_4 extras din bacteriofag T_4 și cuplat de celuloză (97), izolarea de ARN de transfer pe 5′-AMP cuplat de celuloză (98), izolarea de ARN mesager pe suportul afin rezultat din cuplarea acidului poliuridilic sau oligotimidinic de un suport insolubil (99) (100).

De natură complet diferită este interacțiunea dintre acidul 3-aminobenzen boronic imobilizat și ARN sau a fragmentelor sale. Acidul boronic și derivații săi formează în mediu alcalin, după cum se știe, cu compuși care dispun de două grupări OH în poziția cis (eritro), complecși care se descompun în mediu acid. Acești complecși se formează și cu riboza, cînd grupările ei hidroxilice de la C_2 și C_3 sînt libere. Pe baza acestei proprietăți se pot separa ribonucleozidele, 5′-ribonucleotidele, oligo-ribonucleotidele precum și ARN-t cu poziția 2′ și 3′ terminală nesubstituită, de toate combinațiile substituite în poziția 2′ și 3′, precum și de toți 2′-dezoxiribozo-derivații acizilor dezoxiribonucleici.

ÎNCHEIERE

Din cele prezentate mai sus rezultă că, prin specificitatea sa ridicată și prin cunoscutul efect de protejare exercitat de efectorii imobilizați asupra macromoleculelor biologic labile, cromatografia de afinitate a permis în numeroase cazuri izolări de substanțe biologic labile, imposibil de realizat cu metodele clasice folosite pînă în prezent.

Prezentat la redacție
la 8 decembrie 1977

Institutul de Științe Biologice
București
Colectivul de Enzimologie, Splaiul Independenței 296
77748 — București, România

BIBLIOGRAFIE

1. E. Starkenstein, Biochem. Z., **24**, 210 (1910).
2. O. Holmbergh, Biochem. Z., **258**, 134 (1933).
3. P. Cuatrecasas, W. Wilchek, C. B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., **61**, 636 (1968).

4. D. H. CAMPBELL, E. LÜSCHER, L. S. LERMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **37**, 575 (1951).
5. L. S. LERMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **39**, 232 (1953).
6. C. ARSENIS, D. B. MCCORMICK, J. Biol. Chem., **239**, 3093 (1964).
7. C. ARSENIS, D. B. MCCORMICK, J. Biol. Chem., **241**, 330 (1966).
8. P. CUATRECASAS, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
9. H. D. SCHELL, T. BENȚIA, M. A. MATEESCU, Brevet românesc nr. 65382/1977.
10. R. EPTON, T. H. THOMAS, *An introduction to water-insoluble enzymes*, Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Bucks., Anglia.
11. *** *Präparate für die Affinitätschromatographie*, Merck, Darmstadt, R.F.G., 1976.
12. M. A. MITZ, L. J. SUMMARIA, Nature, **189**, 576 (1961).
13. M. LILLY, C. MONEY, W. HORNBY, E. M. CROOK, Biochem. J., **95**, 45 (1965).
14. C. J. EPSTEIN, C. B. ANFINSEN, J. Biol. Chem., **237**, 2175 (1962).
15. N. WELIKY, H. H. WEETALL, R. V. GILDEN, D. H. CAMPBEL, *Immunochemistry*, **1**, 219 (1964).
16. W. F. LINE, A. KWONG, H. H. WEETALL, Biochem. Biophys. Acta, **242**, 194 (1971).
17. H. H. WEETALL, Science, **166**, 615 (1969).
18. L. WIDE, J. PORATH, Biochem., Biophys. Acta, **130**, 257 (1966).
19. L. WIDE, R. AXÉN, J. PORATH, Immunochemistry, **4**, 381 (1967).
20. D. H. CAMPBEL, E. LÜSCHER, L. S. LERMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **37**, 575 (1951).
21. A. MALLEY, D. H. CAMPBEL, J. Chem. Soc., **85**, 487 (1963).
22. H. H. WEETALL, N. WELIKY, Nature, **204**, 896 (1964).
23. R. V. DAVIS, R. M. BLANKEN, R. J. BEAGLE, Biochemistry, **8**, 2706 (1969).
24. H. H. WEETALL, Nature, **223**, 959 (1969).
25. E. STEERS, P. CUATRECASAS, H. B. POLLARD, J. Biol. Chem., **246**, 196 (1971).
26. B. R. BAKER, H. U. SIEBENEICK, J. Med. Chem., **14**, 799 (1974).
27. J. PORATH, în *Analysis and control of immobilized enzyme systems* ed. D. Thomas şi J. P. Kernevez, North-Holland, Publishing Company, Amsterdam, 1976, p. 71.
28. G. KAY, E. M. CROOK, Nature **216**, 514 (1967).
29. G. KAY, M. LILLY, A. K. SHARP, R. J. H. WILSON, Nature, **217**, 641 (1968).
30. R. J. H. WILSON, G. KAY, M. LILLY, Biochem. J., **108**, 845 (1968).
31. A.K. SHARP, G. KAY, M. LILLY, Biotech. Bioeng., **11**, 363 (1969).
32. R. J. H. WILSON, M. LILLY, Biotech. Bioeng., **11**, 349 (1969).
33. L. S. LERMAN, Nature, **172**, 635 (1953).
34. H. H. WEETALL, N. B. HAVEWALA, Biotech. Bioeng., Symp. nr. 3, **241** (1972).
35. R. AXÉN, J. PORATH, S. ERNBACK, Nature, **214**, 1302 (1967).
36. J. PORATH, R. AXÉN, S. ERNBACK, Nature, **215**, 14 (1968).
37. H. H. WEETALL, Nature, **223**, 959 (1969).
38. H. H. WEETALL, Science, **166**, 615 (1969).
39. H. H. WEETALL, Biochim. Biophys. Acta. **212**, 1 (1970).
40. H. H. WEETALL, G. BAUM, Biotechnol. Bioeng., **12**, 399 (1970).
41. H. H. WEETALL, L. S. HERSH, Biochim. Biophys. Acta, **206**, 54 (1970).
42. W. BRÜMMER, Kontakte. **1**, 23 (1974).
43. P. J. ROBINSON, P. DUNNILL, M. D. LILLY, Biochim. Biophys. Acta, **285**, 28 (1972).
44. H. TSCHESCHE, T. DIETL, Eur. J. Biochem., **30**, 560 (1972).
45. W. BRÜMMER, N. HENNRICH, H. D. ORTH, Date nepublicate, citat după (42).
46. H. D. SCHELL, T. BENȚIA, C. DÎNCUȘ, Date nepublicate.
47. H. FRITZ, G. WUNDERER, B. DITTMANN, Z. Physiol. Chem., **353**, 893 (1972).
48. M. K. PANGBURN, Y. BURTEIN, P. H. MORGAN, K. A. WALSH, H. NEURATH, Biochem., Biophys. Res. Commun., **54**, 371 (1973).
49. L. G. SPARROW, A. B. MCQUADE, Biochim. Biophys. Acta. **302**, 90 (1973).
50. G. FEINSTEIN, A. GERTLER, Biochim. Biophys. Acta. **309**, 196 (1973).
51. P. CORVOL, C. DEVAUX, J. MENARD, FEBS Lette, **34**, 189 (1973).
52. K. MURAKAMI, T. INAGAMI, A. M. MICHELAKIS, S. COHEN, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 482 (1973).
53. M. WILCHEK, M. GORECKI, Eur. J. Biochem., **11**, 491 (1969).
54. R. K. WIERENGA, J. D. HUIZENGA, W. GAASTRA, G. W. WELLING, J. J. BEINTEMA, FEBS Lett., **31**, 181 (1973).
55. O. BERGLUND, F. ECKSTEIN, Eur. J. Biochem., **28**, 492 (1972).
56. W. ROHDE, A. G. LEZIUS, Z. Physiol. Chem., **352**, 1507 (1971).
57. P. V. DANENBERG, R. J. LANGENBACH, C. HEIDELBERGER, Biochem. Biophys. Res. Commun. **49**, 1029 (1972).
58. C. R. LOWE, P. D. G. DEAN, FEBS Lett., **14**, 313 (1971).
59. B. SPROSSLER, F. LINGENS, FEBS Lett., **6**, 232 (1970).
60. I. RAHIMI-LARIDJANI, H. GRIMMINGER, F. LINGENS, FEBS Lett., **30**, 185 (1973).

61. H. Grimminger, I. Rahmi-Laridjani, K. Körner, F. Lingens, Fees Lett., **35**, 273 (1973).
62. L. A. A. Sluyterman, J. Wiedenes, Biochim. Biophys., Acta. **200**, 595 (1970).
63. K. Brocklehurst, J. Carlsson, M. P. J. Kierstan, E. M. Crook, Biochem. J., **133**, 573 (1973).
64. H. Keilova, V. Tomasek, Febs Lett., **29**, 335 (1973).
65. K. Hochstrasser, P. Reichert, S. Schwarz, E. Werle, Z. Physiol. Chem., **354**, 923 (1973).
66. K. Hochstrasser, H. Feuth, O. Steiner, Z. Physiol. Chem., **354**, 927 (1973).
67. K. Hochstrasser, K. Hochgesand, R. Schuster, K. Baader, F. Pecher, H. Fritz, N. Heimburger, Z. Klin. Chem. Klin. Biochim. **11**, 286 (1973).
68. J. G. Beeley. E. McCairns, Biochim. Biophys. Acta. **271**, 204 (1972).
69. J. Chauvet, R. Acher, Febs Lett., **23**, 317 (1972).
70. J. Turkova, O. Hubalkova, M. Krivakova, J. Coupek, Biochim. Biophys. Acta, **322**, 1 (1973).
71. U. Lindberg, S. Erikson, Eur. J. Biochem., **18**, 474 (1971).
72. A. A. M. Gribnau, J. G. G. Schoenmakers, M. van Kraaikamp, H. Bloemendal, Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 1064 (1970).
73. Y. Akanuma, T. Kuzuya, M. Mayashi, T. Ide, N. Kuzuya, Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 947 (1970).
74. D. Gospodarowicz, J. Biol. Chem., **247**, 6491 (1972).
75. R. F. Murphy, K. D. Buchanan, D. T. Elmore, Biochim. Biophys. Acta, **303**, 918 (1973).
76. A. J. Kenyon, J. E. Gander, C. Lopez, R. A. Good, Science **179**, 187 (1973).
77. P. Cuatrecasas, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 1277 (1972).
78. F. Krug, B. Desbuquois, P. Cuatrecasas, Nature New Biology, **234**, 268 (1971).
79. V. Sica, E. Nola, I. Parikh, G. A. Puca, P. Cuaterecasas, Nature New Biology, **244**, 36 (1973).
80. P. M. Blumberg. J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 3751 (1972).
81. R. L. Lefkowitz, E. Haber, D. O'Hara, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 2828 (1972).
82. R. H. Allen, P. W. Majerus, J. Biol. Chem., **247**, 7702 (1972).
83. R. H. Allen, C. S. Mehlmann, J. Biol. Chem., **248**, 3660 şi 3670 (1973).
84. R. W. Olsen, J. C. Meunier, J. P. Changeux, Febs Lett., **28**, 96 (1972).
85. W. H. Hopff, G. Riggio, P. G. Waser, Febs Lett., **35**, 220 (1973).
86. I. J. Goldstein, C. M. Reichert, A. Misaki, P. A. J. Gorin, Biochim. Biophys. Acta, **317**, 500 (1973).
87. W. Bessler, I. J. Goldstein, FEBS Lett., **34**, 58 (1973).
88. C. J. Smith, P. C. Kelleher, Biochim. Biophys. Acta. **307**, 231 (1973).
89. D. Allan, J. Auger, M. J. Crumpton, Nature New Bioloy, **236**, 23 (1972).
90. M. J. Hayman, J. I. Skehel, M. J. Crumpton, FEBS Lett., **29**, 185 (1973).
91. J. A. Gordon, S. Blumberg, H. Lis, N. Sharon, FeBS Lett., **24**, 193 (1972).
92. J. H. Shaper, R. Barker, R. L. Hill, Anal. Biochem., **53**, 564 (1973).
93. N. Gilboa-Garber, L. Mizrahi, N. Garber, Febs Lett., **28**, 93 (1972),
94. D. D. Soderman, J. Germershausen, H. M. Katzen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 792 (1973).
95. G. M. Edelman, U. Rutishauser, C. F. Milette, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**. 2153 (1971).
96. H. Wigzell, Transplant Rev., **5**, 76 (1970).
97. E. F. K. Bautz, B. D. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **48**, 400 (1962).
98. S Erhan, L. Northrup, F. A. Leach, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **53**, 646 (1965).
99. U. Lindberg, T. Persson, Eur. J. Biochem., **31**, 246 (1972).
100. H. Aviv, P. Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**. 1408 (1972).

61. H. Grimmingen, I. Rahm-Lariojani, K. Körner, F. Lingens, Fees Lett., 35, 273 (1973).
62. L. A. A. Sluyterman, J. Wijdenes, Biochim. Biophys. Acta, 200, 395 (1970).
63. K. Brocklehurst, J. Carlsson, M. P. J. Kierstan, E. M. Crook, Biochem. J., 133, 573 (1973).
64. H. Kuilova, V. Tomasek, Fees Lett., 29, 335 (1973).
65. K. Hochstrasser, P. Brichert, S. Schwarz, E. Wehle, Z. Physiol. Chem., 354, 925 (1973).
66. K. Hochstrasser, H. Feldh, O. Stiliner, Z. Physiol. Chem., 354, 927 (1973).
67. K. Hochstrasser, K. Hochstrasser, K. Schuster, K. Baader, F. Fecher, H. Fritz, N. Heimburger, Z. Klin. Chem. Klin. Biochim., 11, 286 (1973).
68. J. G. Bailey, E. McCabes, Biochim. Biophys. Acta, 271, 204 (1972).
69. J. Chauve, H. Achol, Fees Lett., 23, 317 (1972).
70. J. Turkova, O. Hubalkova, M. Kuivakova, J. Coupek, Biochim. Biophys. Acta, 322, 1 (1973).
71. U. Lindberg, S. Eriksson, Eur. J. Biochem., 18, 474 (1971).
72. A. A. M. Griffiths, J. G. G. Schoenmakers, M. van Kraaikamp, H. Bloemendal, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1064 (1970).
73. Y. Akanuma, T. Kuzuya, M. Mayasu, T. Ide, N. Kuzuya, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 917 (1970).
74. D. Gospodarowicz, J. Biol. Chem., 247, 6491 (1972).
75. P. F. Murphy, K. D. Buchanan, D. T. Elmore, Biochim. Biophys. Acta, 303, 918 (1973).
76. A. J. Kenyon, J. E. Gandre, C. Lopez, R. A. Good, Science 179, 187 (1973).
77. P. Cuatrecasas, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 1277 (1972).
78. F. Krug, B. Desbuquois, P. Cuatrecasas, Nature New Biology, 234, 268 (1971).
79. V. Sica, E. Nola, I. Parikh, G. A. Puca, P. Cuatrecasas, Nature New Biology, 244, 36 (1973).
80. P. M. Blumberg, J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 3751 (1972).
81. R. L. Lerrowitz, E. Haber, D. O'Hara, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2828 (1972).
82. R. H. Allen, P. W. Majerus, J. Biol. Chem., 247, 7702 (1972).
83. R. H. Allen, C. S. Mehlmann, J. Biol. Chem., 248, 3660 si 3670 (1973).
84. R. W. Olsen, J. C. Meunier, J. P. Changeux, Fees Lett., 18, 96 (1972).
85. W. H. Hopff, G. Riggio, P. G. Waser, Fees Lett., 35, 220 (1973).
86. L. J. Goldstein, C. M. Brichert, A. Misaki, P. A. J. Gorin, Biochim. Biophys. Acta, 317, 500 (1973).
87. W. Bessler, I. J. Goldstein, FEBS Lett., 34, 58 (1973).
88. C. J. Smith, P. C. Kellerer, Biochim. Biophys. Acta, 307, 231 (1973).
89. D. Allan, J. Auger, M. J. Crumpton, Nature New Biology, 236, 28 (1972).
90. M. J. Hayman, J. L. Skehel, M. J. Crumpton, FEBS Lett., 29, 185 (1973).
91. J. A. Gordon, S. Blomberg, H. Lis, N. Sharon, FeBS Lett., 24, 193 (1972).
92. J. H. Shaper, R. Barker, R. L. Hill, Anal. Biochem., 53, 564 (1973).
93. N. Gilboa-Garber, L. Mizrahi, N. Garber, Fees Lett., 29, 93 (1972).
94. D. D. Soderman, J. Germershausen, H. M. Katzen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 792 (1973).
95. G. M. Edelman, U. Rutishauser, C. E. Millettis, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2153 (1971).
96. H. Wiezell, Transplant Rev., 5, 76 (1970).
97. E. F. K. Bautz, B. D. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 400 (1962).
98. S. Erhan, L. Nortmeyer, E. A. Leach, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 646 (1965).
99. U. Lindberg, T. Persson, Eur. J. Biochem., 31, 246 (1972).
100. H. Aviv, P. Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1408 (1972).

RECENZII

Proceedings in Life Sciences, Structure and Function of Haemocyanin (Structura şi funcţiile hemocianinelor), Ed. de J. V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, New York, 1977, 295 p., 195 fig.

Proteine de o mare importanţă fiziologică, hemocianinele s-au bucurat chiar din momentul descoperirii lor de o mare atenţie din partea oamenilor de ştiinţă de cele mai deosebite formaţii (biologi, chimişti etc.). Acest fapt este însă şi rezultatul complexităţii problemelor pe care le-au ridicat pentru chimie care la vremea aceea (1867) era ea însăşi în plină formare a unor ramuri fără de care probelma hemocianinelor nu putea primi nici măcar în principiu o rezolvare cît de cît ştiinţifică. Este vorba de chimia proteinelor şi de cea a combinaţiilor complexe, ambele capitale pentru înţelegerea şi explicarea proprietăţilor fiziologice ale hemocianinelor. Stimulat de progresul acestor discipline precum şi de marile progrese ale biologiei moleculare, studiul hemocianinelor îşi găseşte în prezent o bază adecvată în abordarea sa cu mijloacele moderne ale biochimiei şi biofizicii. Din acest punct de vedere volumul de faţă este, în conţinut, o carte de biochimie şi biofizică a cărei subiect îl constituie hemocianinele privite ca : transportori de oxigen, proteine, complecşi (stricto sensuu) ai cuprului şi modele de evoluţie a unui tip de macromolecule cu funcţie biologică. După cum se vede un fel de a privi lucrurile destul de complex şi interdisciplinar a stat la baza prezentării acestei probleme. Nici nu putea fi altfel deoarece volumul conţine lucrările unei întruniri internaţionale pe această temă, care a avut loc la Laboratorul de Biologie Marină al Universităţii din Malta. Intrunirea a fost sprijinită de Organizaţia Europeană de Biologie Moleculară şi Universitatea din Malta. Această întrunire este a cincea de acest fel. Lucrările prezentate privesc aspecte foarte variate ale problemei relaţiei funcţie-structură la hemocianine, cele mai importante direcţii fiind : echilibrul de disociere al subunităţilor moleculei de hemocianină de diverse tipuri, structura subunităţilor moleculelor, de hemocianine aşa cum reiese ea din diversele tipuri de scindări pe care le pot suferi, proprietăţile fizice ale hemocianinelor, proprietăţile de complecşi ai cuprului ale hemocianinelor, reacţii ale hemocianinelor, consideraţii evolutive asupra hemocianinelor, consideraţii fiziologice asupra hemocianinelor etc. Deşi adresată în primul rînd cercetătorilor din domeniu, cartea este o foarte bună lectură pentru toţi cei care vor să cunoască ceva despre biologia moleculară a hemocianinelor.

Mihai Zamfir-Grigorescu

PETER KARLSON, *Kurzes Lehrbuch der Biochimie für Mediziner und Naturwissenschafler* (Scurt manual de biochimie pentru medicinişti şi naturalişti) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977, 414 p., 90 fig., 287 scheme, 23 tab.

Ajunsă la cea de-a zecea ediţie îmbunătăţită, cunoscuta lucrare a lui P. Karlson este un eveniment editorial de prim ordin căci deşi nu este adresată biochimiştilor ea constituie nu numai un model de tratare biochimică, dar totodată şi un exemplu de simţ de răspundere pentru litera tipărită, căci totul în acest volum poartă amprenta elaborării şi a profundei reflecţii. Limbajul este sobru şi clar găsind în permanenţă soluţia cea mai precisă, iar materialul ilustrativ este nu doar sugestiv şi adecvat ci mai ales riguros ştiinţific aşa cum am dori-o chiar şi la publicaţiile mai pretenţioase. Cu toate că îşi recunoaşte doar scopuri didactice, şi încă şi acelea nu pentru biochimişti, manualul include în actuala sa formă, spre deosebire de ediţiile precedente, numeroase progrese pe care biochimia le-a realizat între timp. Un asemenea exemplu îl constituie influenţa unor substanţe de tipul hormonilor asupra acizilor nucleici. Deşi reţinut în ipoteze, autorul nu renunţă nici un moment la prezentarea semnificaţiei proceselor biochimice de la nivelul diverselor structuri cum ar fi sistemele polienzimatice. Lucrarea este de asemenea îmbunătăţită

și prin adaosul unor mai substanțiale elemente de farmacodinamie, ceea ce sporește considerabil utilitatea ei pentru înțelegerea aspectelor mai delicate de fiziologie. Regretăm sincer faptul că lucrarea nu este tradusă în română. Contactul multora cu biochimia ar deveni ușor, plăcut și util.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Depressed metabolism and cold thermogenesis (Metabolism redus și termogeneză la rece), Ed. de L. Janský, Editura Universității Karlova Praha, 1975, 286 p., 159 fig. și tab.

Problemele termofiziologiei s-au impus atenției oamenilor de știință de mult timp. Ele însă, în pofida unui abundent trecut de studii, continuă să fie de o mare actualitate datorită complexității lor deosebite. Acest fapt explică de altfel de ce studierea acestei probleme nu se mai poate concepe astăzi decît într-un mod interdisciplinar. Volumul, sub redacția lui L. Janský, reprezintă Lucrările Simpozionului Asociat celui de al XXVI-lea Congres Internațional de Științe Fiziologice, care a avut loc la Praga (R. S. Cehoslovacia), între 9—12 octombrie 1974. Simpozionul a fost organizat de Facultatea de Științe a Universității Karlova și de Societatea Cehoslovacă de Fiziologie în colaborare cu Universitatea din Missouri, Columbia, și a fost susținut de Comisia Termală a I.U.P.S. Termofiziologia comportă, în etapa actuală, în principal, două direcții de studiu, și anume : mecanismele de producere a căldurii la nivelul efectorilor și procesele de control central. Aceste direcții se împart actualmente între două categorii : biochimiștii și respectiv electrofiziologiștii. Lucrările simpozionului s-au desfășurat în cadrul a șapte secții, după cum urmează : 1. *Efectul frigului asupra termogenezei hormonale* ; 2. *Mecanisme de acțiune hormonală în decursul termogenezei* ; 3. *Reglarea metabolismului țesutului adipos brun* ; 4. *Rolul transmisiei centrale aminergice în termogeneză* ; 5. *Activitatea neuronală în decursul termogenezei* ; 6. *Mecanisme periferice și centrale de reglarea producerii căldurii* ; și 7. *Termogeneza în normo-și hipotermie.* Sînt studiate atît cazuri tipice din punctul de vedere al termogenezei, cum ar fi rozătoarele și hibernanții, precum și unele mai puțin tipice însă foarte importante pentru noi, copiii nou născuți. Se analizează cei mai semnificativi factori ai controlului hormonal în termogeneza indusă de frig, cum a fi : controlul beta adrenergic al termogenezei induse de frig, efectul calorigen al epinefrinei, efectul hormonilor asupra lipolizei țesutului adipos la copiii nou născuți, catecolaminele și tiroxina sangvină la oamenii expuși la frig în cursul exercițiilor fizice, homeotermia creierului etc. Mecanismele acțiunii hormonale în decursul termogenezei sînt studiate prin mijloace dintre cele mai variate ca de exemplu încorporarea de aminoacizi marcați în proteinele hepatice (ale șobolanilor expuși la frig), schimbările biochimice și structurale ale țesuturilor aclimatizate la temperaturi joase, sinteza de ADN și conținutul de acizi nucleici în țesutul adipos, răspunsul alterat la insulină în țesuturile rezistente la frig, termogeneza musculară consecutivă adaptării la frig etc. Reglarea metabolismului țesutului adipos brun, este și ea tratată din mai multe puncte de vedere. Unul dintre acestea vizează controlul respirator al țesutului adipos perfuzat, permițînd și foarte bune posibilități de cuantificare. Baza biochimică a proceselor din acest țesut este studiată atent, una din lucrări ocupîndu-se de efectele aclimatizării la frig asupra AMP ciclic din adipocitele brune și albe, iar o altă lucrare studiind raportul ATP/ADP în mitocondriile și spațiile extramitocondriale ale țesutului adipos. Lucrarea, deși cu un profil de fiziologie animală prezintă un interes deosebit pentru multe alte categorii de profesii, fiind în plus deosebit de bine prezentată din punct de vedere grafic.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Flavonoids and bioflavonoids, current research trends (Flavone și bioflavone, Tendințe curente în cercetare), Ed. de L. Farkas, M. Gabor și F. Kállay, Editura Academiei Budapesta, 1977, 467 p.

Cercetarea pigmenților flavonici s-a petrecut de la început sub semnul impactului cu biochimia, așa cum a fost cazul multor categorii de produși naturali. Descoperirea ulterioară a anumitor posibilități de folosire a lor în medicină a impulsionat în mod evident dezvoltarea interesului pentru studiul lor. Implicit, unele direcții de studiu, cum ar fi cercetările alimentare de exemplu, au fost din acest motiv revitalizate ajungînd la statutul unor probleme de mare im-

portanță. Din punct de vedere teoretic acești compuși au prezentat pentru cercetare dublul avantaj de a se preta la elaborarea unor studii model și de a fi bine caracterizabili chimic, biochimic etc. Se poate spune prin urmare că interesul pe care îl suscită derivă atît din rațiuni de ordin teoretic cît și din considerente practice. Interesul pentru diferitele aspecte ale acestui subiect și-a găsit expresia în organizarea unor simpozioane cu participare internațională la Mátrafüred, în R.P. Ungaria. Ele valorifică pentru știința ungară, tradiția descoperitorului vitaminei C, care a avut fructuoase preocupări și în domeniul flavonelor, cărora le-a stabilit un statut de vitamine. Volumul de față prezintă Lucrările celui de-al V-lea Simpozion Ungar de Bioflavone, din 25—27 mai 1977. Cele 43 de lucrări prezentate conțin aspectele cele mai diverse ale chimiei și biochimiei flavonelor. Lucrarea de început a simpozionului se ocupă cu izolarea din Lonchocarpus neuroscapna, o leguminoasă, a unui nou tip de flavonă. Sînt discutate chestiuni privind biosinteza în plante, rolul fiziologic, și în mod deosebit structura acestui compus ca bază materială a proprietăților sale. Unele comunicări privesc efectele fiziologice ale flavonelor, ca de exemplu : efectul antifungic, efectul de menținere a rezistenței capilare, efectul de stimulare a axei pituitară-adrenală, efectul de prelungire a acțiunii epinefrinei etc. Altele însă tratează în exclusivitate aspectele de sinteză chimică cum ar fi : *Cîteva aplicații recente ale transpoziției oxidative a calconelor în prezența azotatului de taliu (III) pentru sinteza flavonelor naturale și a glicozizilor izoflavonici* sau *Aplicarea transpoziției oxidative a calconelor în prezența azotatului de taliu (III) pentru sinteza izoflavonelor prenilate. Sinteza jamaicinei și leicarpinei.* Sînt prezente de asemenea lucrări care discută anumite aspecte ale chimismului flavonelor, derivînd din structura lor și fiind în măsură să explice anumite laturi ale importanței lor fiziologice. Asemenea proprietăți sînt reacțiile oxo-ale sulfonelor și sulfoxizilor flavonici, reacțiile derivaților flavonici cu hidroxilamina, formarea compușilor metalici ai antocianilor, substituția nucleofilă a flavonelor etc. Un alt grup de lucrări discută rolul fiziologic al flavonelor în viața plantelor, din această categorie remarcîndu-se : metabolismul flavonelor în plantele superioare, comportarea sintezei compușilor aromatici în plantele superioare—studii asupra cloroplastelor izolate și altele. Nu lipsesc nici studiile asupra metodelor fizice și proprietăților fizice ale flavonelor, fiind remarcabile în acest sens lucrările asupra tehnicilor chirooptice și dicroismului circular. Trebuie să remarcăm abundența foarte mare a formulelor chimice, tabelelor și reprezentărilor, care împreună cu indexul de cuvinte-cheie (de la sfîrșitul volumului) traduc trăsătura cea mai importantă a volumului—claritate și coeziune.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Electrical processes in atmospheres (Procese electrice în atmosfere), Ed. de Hans Dolezalek și Reinhold Reiter, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1977, 865 p., 478 fig. și 42 tab.

La 2—7 septembrie 1974 s-au desfășurat lucrările celei de-a V-a Conferințe Internaționale asupra Electricității. Conferința a avut loc în Garmisch-Partenkirchen în Alpii Bavariei (R. F. Germania) și s-a bucurat de un multiplu sprijin, printre susținători figurînd : Organizația Mondială de Meteorologice, Comisia Internațională a Electricității Atmosferice a Asociației Internaționale pentru Meteorologie și Fizică Atmosferică, Institutul (și deci Societatea) Freunhofer pentru Cercetarea Ambianței Atmosferice, Guvernul R. F. Germania, Asociația Germană de Cercetare, Statul Bavaria, Orașul Garmisch-Partenkirchen etc. Conferința s-a desfășurat în cadrul a 12 sesiuni și s-a încheiat cu anumite concluzii pe care le-a tras J. L. Koenigsfield, președinte al Comisiei Internaționale pentru Electricitate Atmosferică. Sesiunile se intitulează după cum urmează : 1. *Ioni, cercetări fundamentale* ; 2. *Ioni, cercetări aplicate* : *Electricitate atmosferică și meteorologie* ; 2. *a. Aplicarea conceptelor și metodelor electricității atmosferice altor părți ale meteorologiei/ Film al cîmpurilor electrice la sol sub furtună* ; 3. *Principii și probleme de instrumentar, Metode pentru calibrare și manevrarea datelor* ; 4. *Fizica norilor, Nori neconducători de precipitații* ; 6. *Circuit global și program de 10 ani* ; 7. *Legătura atmosferică-spațiu, Efecte solar-terestre, Electricitatea atmosferică pe alte corpuri cerești* ; 8. a *Fizica fulgerelor și trăznetelor, Partea I* ; 8. b. *Fizica fulgerelor și trăznetelor, Partea II* ; 9. *Adaosuri ulterioare* ; 10. *Activitățile electrice ale institutului pentru cercetări atmosferice ambiante.* Această conferință, cu o agendă atît de încărcată ridică probleme deosebit de interesante atrăgînd totodată atenția asupra unor categorii de fenomene pe cît de pasionante ca studiu tot pe atît de interesante pentru viața de pe pămînt și chiar pentru ceea ce se petrece în univers. Este însă necesar să fie subliniat faptul că problemele nu sînt numai enunțate și propuse pentru o rezolvare „sine die", ci sînt în bună măsură și

rezolvate cu metode adecvate. Din acest punct de vedere volumul demonstrează pe deplin că ne găsim în fața unei științe autentice, cu problemele dar și cu metodicile sale de cercetare, și ceea ce este mai important, cu perspectivele ei certe de evoluție. Numeroasele măsurători, formule și modele experimentale definesc acest domeniu ca pe o știință pozitivă, dotată cu toate atributele exactității și corectitudinii științifice. Lucrarea, deși sobră are totuși o ilustrație abundentă și sugestivă ceea ce o face ușor de urmărit în condițiile unei rapide și totale asimilabilități a materialelor prezentate. Limbajul cu toate că are o structură caracteristică, de specialitate, este totuși, sobru și simplu trădînd un conținut național abundent și viguros. Discuțiile și concluziile se situează la un înalt nivel științific și sînt de o remarcabilă conciziune. Volumul conține nu mai puțin de cinci indexuri (de autori, de chimicale și simboluri, de localități și arii, de instituții, agenții și organizații și de subiecte). Aceasta dovedește deosebita organizare a materialului și marea grijă a autorilor pentru utilizarea deplină a conținutului lucrărilor. Ne este greu să încheiem fără să spunem că volumul are o ținută grafică dintre cele mai bune.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Proceedings in Life Sciences, *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity* (Noi produse naturale și medicamente din plante cu activitate farmaceutică, biologică sau terapeutică), Ed. de H. Wagner și P. Wolff, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, 286 p. 152 fig.

Volumul conține Lucrările Primului Congres Internațional de Cercetarea Plantelor Medicinale, secția A, care a avut loc în 6—12 septembrie 1976, la Universitatea din Munchen (R. F. Germania). Lucrarea conține opt capitole în care se încearcă o anumită sistematizare a unui material faptic deosebit de bogat. Din acest motiv criteriile de clasificare ar putea să pară cam heterogene, dar cum însuși materialul are foarte multe aspecte, acest lucru este, în fond, firesc. Datorită faptului că plantele sînt din punct de vedere terapeutic un domeniu practic virgin, (doar 5% fiind folosite), se pune problema, și face obiectul primului capitol, să se dezvolte o metodologie adecvată pentru selectarea acelor componente ale plantelor care ar putea fi de oarecare utilitate farmaceutică. Metodele practice precum și cele propuse beneficiază de un tratament critic ceea ce face ca discuția lor să se finalizeze în anumite recomandări și prognoze. În cel de-al doilea capitol se fac chiar tentative de tratare cantitativă a chestiunilor privitoare la selecția preparatelor de principii active din plante. Sînt tratate uneori extractele care au un anumit tip de acțiune (agenți antitumorali și citotoxici-capitolul III și antibiotice-capitolul IV). iar uneori extractele ale căror principii active aparțin anumitor clase (terpenoizi-capitolul V, saponine-capitolul VI). Uneori criteriul structurii și al sintezei devine el însuși scop al unui capitol cum ar fi capitolul VII, în care sînt tratați compușii naturali dimeri cu acțiune farmacologică. Este însă de subliniat că aceste criterii se întrepătrund, autorii neabsolutizîndu-l pe nici unul ci dimpotrivă făcînd din aplicarea lor suplă una din principalele virtuți ale acestui volum. Capitolul III, pur și simplu, dincolo de orice încercare de sistematizare „ab iniito", grupează cercetările privind plantele medicinale folosite în mod tradițional în India, căutînd în subsidiar o ordonare mai mult formală după criteriul structurii (alcaloizi, glicozizi, terpenoizi, heterocicli cu O, etc.) În fine o ultimă clasă-neolignanii, formează obiectul capitolului IX. Bogate în analize bazate pe fiziologie, biochimie, farmacodinamie etc., capitolele lucrării au un nivel teoretic ridicat, însă, așa cum este și firesc, în asemenea cazuri, aceasta conduce la orientări practice de mare valoare. Este cazul ultimului capitol în care se trag concluzii privitoare la sinteza modernă a medicamentelor. O remarcă deosebită trebuie făcută în privința modului serios de prezentare a problemelor chimice, exprimat prin preocuparea constantă pentru legătura dintre structurile chimice ale compușilor și aspectele lor biologice, adesea foarte bine definite.

Mihai Zamfir-Grigorescu

J. M. Cushing, *Lecture Notes in Biomathematics*, vol. 20, editor S. Levin ; *Integrodifferential Equations and Delay Models in Population Dynamics* (Ecuații integrodiferențiale și modele cu întîrziere în dinamica populațiilor) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 196 p. $ 8,3

Științele naturii au cunoscut un salt în dezvoltarea lor ori de cîte ori vreo legitate a lor s-a putut formula, într-o formă sau alta, matematic. Ecologia este un domeniu în care în ultimele decenii au apărut tot mai multe formulări și modelări matematice, permițînd o mai clară eviden-

ţiere a unor deducţii, dependenţe, legităţi, o exprimare mai evidentă precum şi unele pronosticări.

Un model matematic este în esenţă un sistem de ecuaţii care exprimă dependenţele dintre parametrii utilizaţi. Modelul matematic fiind o abstractizare, se bazează pe un număr limitat de legităţi neglijînd restul de dependenţe cunoscute dar considerate ca mai puţin importante. Valoarea informatică a modelului depinde tocmai de justeţea alegerii legităţilor şi dependenţelor care stau la baza modelului. Tipul ecuaţiilor utilizate determină tipul modelului.

Majoritatea modelelor formulate pntru a descrie dinamica populaţiei referitoare la o singură specie sau mai multe specii, descriu într-un mod sau altul rata de creştere a speciei pe unitatea de timp, neglijînd, în primă instanţă, factori ca structură de vîrstă, distribuţie spaţială, difuzie, efecte întîrziate.

Lucrarea lui Crushing îşi propune să prezinte unele modele diferenţiale în care ratele de creştere depind de mărimea populaţiei la un moment s anterior lui t. O asemenea presupunere duce la ecuaţii diferenţiale funcţionale.

În general este recunoscută importanţa efectelor întîrziate în biologie şi în particular în dinamica populaţiilor. Aceste efecte întîrziate se află sub reglajul fin al tuturor factorilor care afectează sistemul respectiv aşa încît modelele în mod necesar nu pot fi decît parţiale. Un model total ar fi atît de vast încît nu ar avea nici o valoare practică fiind prea dificil de operat.

Scopul principal al lucrării lui Crushing este de a exprima efecte de întîrziere prin modele matematice diferenţiale în probleme de ecologie în condiţiile în care se cunosc stabilitatea echilibrelor şi natura oscilaţiilor densităţilor speciilor.

Un scop mai general îl constituie intenţia de a introduce pe cititor în probleme ale modelării matematice în ecologie precum şi discuţia unor subiecte pur matematice : teoria stabilităţii pentru sisteme integrodiferenţiale, teoria bifurcaţiei, teoria perturbaţiilor.

Lucrarea nu epuizează întregul domeniu, fiind însoţită de o bogată listă bibliografică.

Gabriela Anghel

Advances in Biochemical Engineering, Vol. 6, Ed. de T. K. Gose, A. Fiechter şi N. Blakebrough, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, 1977, 127 p., 28 fig.

Aplicarea fenomenelor microbiologice la diferitele ramuri ale industriei constituie o linie tradiţională în cercetare şi de asemenea în politica economică a ţărilor mai avansate. Oricare ar fi gradul actual de extindere a acestor procese, perspectivele lor practice sînt indiscutabile. Trăsătura comună a acestor aplicaţii, de orice fel, este însă o cunoaştere superioară a fiziologiei microbiene şi prin urmare a nivelului biochimic de evoluţie al respectivelor procese. Unul dintre beneficiarii de mare perspectivă ai acestui domeniu, metalurgia, mai exact hidrometalurgia, face uz de metabolismul unui chemoautotrof cunoscut, Thiobacillus ferrooxidans. De fapt procesul avînd loc, de asemenea în natură, el constituie, cel puţin în parte, mecanismul natural al formării unor minereuri. În aceste condiţii problema revine la a studia cinetica procesului pentru a stabili acele condiţii în care viteza concentrării şi acumulării metalului să fie maximă. În esenţă, acesta este scopul primei părţi a acestui număr. Partea a doua privind biosinteza celulozei şi hidroliza materialelor celulozice atacă o chestiune nu mai puţin serioasă pentru economia mondială : valorificarea energetică şi alimentară a unui compus foarte abundent în natură şi care pînă nu de mult era considerat relativ inert. Este o problemă care deja are o anumită istorie şi constituie un exemplu de trecere de la un punct de vedere practic la unul teoretic, anume cum ar putea fi realizată scindarea unui compus cunoscînd modul în care se desfăşoară procesul invers, biosinteza. Acest punct de vedere, împreună cu un grad sporit de cuantificare, face ca problema să apară mult mai abordabilă. Metabolismul metanolului în ciuperci, capitolul al treilea al acestei lucrări, este un aspect foarte particular nu numai al metabolismului dar totodată şi al unei probleme presante a omenirii — foamea de proteine —. Toate mijloacele au fost supuse unei cercetări sistematice în scopul găsirii unei soluţii. Ciupercile metabolizante de alcool metilic s-au dovedit o direcţie promiţătoare. Aceasta a determinat studierea lor foarte atentă. Localizarea intracelulară a sistemelor metabolizatoare s-a făcut citohistochimic şi electronomicroscopic, obţinîndu-se astfel o mai aprofundată cunoaştere a fenomenului. Rezultatele par a fi pe măsura aşteptărilor. Materialul are o prezentare deosebit de sintetică fiind ilustrat cu numeroase scheme metabolice, tabele şi grafice deosebit de sugestive, ceea ce demonstrează un înalt grad de cuantificare şi cunoaşterii a fenomenului. Dezvoltarea industriei biosintetice de antibiotice a dus la necesitatea cunoaşterii mai aprofundate a factorilor care îi guvernează evoluţia. Una dintre căile propuse în această

cercetare este controlul sintezei antibioticelor prin fosfat, aceasta constituind și subiectul celui de-al patrulea capitol al lucrării. Alegerea, din considerente de biochimie teoretică, a fosfatului ca parametru de mare importanță pentru biosinteza antibioticelor, s-a dovedit prin cercetarea practică o alegere fericită și cu urmări fertile pentru scopurile industriale. Valorile, cu comentariile aferente, pentru 32 perechi microorganism-antibiotice, sînt o măsură a lărgimii domeniului abordat. Dacă adăugăm acestui fapt, spațiul grafic redus și abundența reprezentărilor (scheme, grafice, tabele etc.) este evident că sîntem în fața unei prezentări condensate, ceea ce constituie dezideratul major al cercetării științifice moderne.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Progress in surface science (Progrese în știința suprafeței), Vol. 6 și 7, Ed. de S. G. Davison, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Paris, Sydney, Frankfurt, 1977, 190 p.

Timpul tratărilor calitative, comportînd aproximații care să lase primul loc flerului, și de ce să nu o recunoaștem, de cele mai multe ori întîmplării, pare să fi trecut. În orice caz, explicațiile vagi în termeni foarte generali, și în fond inconsistente, par a nu mai satisface azi pe nimeni. Acestei situații izvorîte din lipsa unor cunoștințe mai profunde, îi ia locul tot mai mult un studiu dens, exhaustiv care tinde spre folosirea tot mai intensivă a tuturor datelor care pot fi asociate unui fenomen. Rezultatul unui asemenea studiu este și prezenta lucrare în care procesele superficiale sînt tratate cu multă atenție, într-un mod riguros, ajungîndu-se, în consecință, la unele rezultate pozitive — stabilirea legilor care controlează desfășurarea unor fenomene. Evident, acest lucru nu a fost posibil fără folosirea unui anumit aparat matematic. Acest lucru caracterizează în foarte mare măsură volumul de față. Lucrarea conține, în ordine următoarele probleme mai importante, totodată și titlul de capitole : 1. *Teoria cineticii transferului polar de sarcină la interfețele solid-lichid;* 2. *Interacțiunile dintre moleculele adsorbite fizic;* 3. *Bibliografia fenomenelor electronice în chemiosorbție și cataliza asupra semiconductorilor;* 4. *Interfața cristal organic-electrolit;* 5. *Teoria efectului fotoadsorbției la semiconductori;* 6. *Teoria difracției la energii joase;* 7. *Schimbările superficiale de expulzare induse de bombardamentul ionic;* 8. *Expulzarea prin descărcări la incandescență;* 9. *Teorii ale emisiei de la suprafețele metalice* și 10. *Spectrul fotoelectronic al speciilor adsorbite pe tungsten.* După cum se vede chiar și din această simplă enumerare, multe din fenomenele prezentate au importanță, dacă nu direct, cel puțin indirect, adică pentru o mai bună înțelegere a multor fenomene biologice. În această privință se poate spune că lucrarea deschide perspective moderne pentru multe domenii ale biochimiei și prin ea pentru numeroase domenii ale biologiei. Teoria transferului de sarcină, de exemplu, este una pe care cu greu am putea să nu o vedem implicată în vreun proces biochimic. Lucrarea are un pronunțat caracter de fizică. Ea se adresează în primul rînd fizicienilor, chimiștilor, biofizicienilor și biochimiștilor, dar este o lectură utilă și pentru alte categorii (biologi, medici etc.) cărora le-ar facilita formarea unor chestiuni considerate în mod curent ca foarte simple. Lectura ei ar face contactul specialităților mai concret și totodată mai util sub raportul cunoașterii reciproce. Materialul ilustrativ de o foarte bună calitate, este deosebit de sugestiv în explicarea unor probleme mai delicate. Este o carte concisă și clară din care omul hotărît să învețe poate să o facă.

Mihai Zamfir-Grigorescu

VLADIMIR M. PALIC *Government publications* (Publicații guvernamentale), Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1976, 553.

Științele zilelor noastre deși aflate la un nivel superior de cunoaștere sînt realizatoarele unei enorme producții de date faptice și teoretice sau mai pe scurt de material informațional. Acest proces din ce în ce mai amplu și cu adevărate caracteristici explozive a și fost denumit explozie informațională. Dar stabilirea acestui termen ca cetățean obișnuit al limbajului nostru, nu face altceva decît să recunoască și să sublinieze un fenomen cunoscut, greu de suportat și care cere o rezolvare grabnică. Pînă a deveni teorie succintă, condensabilă în formule, informația rămîne un material care trebuie predigerat, preambalat în vederea prelucrării sale științifice adecvate. Acestei sarcini de uriașă importanță și de mare răspundere sînt chemate să-i răspundă, în afara informaticii, și a altor științe, biblioteconomia știința care poate cuantifica și standar-

diza cunoștința exprimată lingvistic în forme scriptice. Volumul de față este un ghid bibliografic de mare anvergură, și din acest motiv el prezintă un interes deosebit pentru foarte mulți și de foarte multe profiluri. Acest fapt cu atît mai mult, cu cît volumul cuprinde și problema manualelor, una dintre cele mai importante nu numai pentru învățămînt ca instituție dar totodată și ca practică autodidactă.

Sînt prezentate aspectele speciale ale cercetării bibliografice la toate nivelele, cu referire printre altele, la felul în care calea bibliografică face legătura diferitelor domenii cu planul național al dezvoltării unei țări. În cadrul problemelor bibliografice un loc deosebit îl ocupă chestiunile bibliografice de știință și tehnologie, referitor la felul în care acestea se pot standardiza în vederea conectării lor la circuitul de stat al valorilor naționale. În sfîrșit trebuie să remarcăm că prezenta lucrare indexează și omologhează din punctul de vedere al subiectului, și țara noastră, acest fapt demonstrînd alături de multe altele, caracterul complet al lucrării.

Deși de un profil cu totul special, lucrarea prezintă un deosebit interes din multiple pnncte de vedere și consultarea ei este utilă pentru mulți.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Results and Problems in Cell Differentiation, Vol. 8, *Biochemical differentiation in insect glands* (Diferențierea biochimică a glandelor insectelor), Ed. de W. Beermann, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 215 p., 110 fig., 34, 10 $ U.S.

Este bine- cunoscut faptul că unele dintre experiențele fundamentale care au stat la baza geneticii moderne, și anume experiențele lui Thomas Morgan s-au desfășurat folosind ca material biologic musculița de oțet — Drosophila melanogaster-un dipter. Aceste experiențe au fost reluate de mulți și de multe ori faptul fiind o recunoaștere nu numai a interesului suscitat de lucrările lui Morgan, dar totodată și o conformare a excepționalei calități, ca model de studiu, a materialului ales. Aceasta explică de ce ulterior au continuat să apară studii de genetică la care folosirea acestui material a devenit tradițională. Evident a existat tendința de găsire a unor variante mai bune. Una dintre aceste situații o regăsim și în volumul de față, în care este studiat controlul genetic și în dezvoltare al sintezei de proteine secretoare de către glandele unor lepidoptere și diptere. Studiile acestea se întreprind din punctul de vedere al procesului diferențierii celulare și au marele avantaj de a beneficia la aceste animale de prezența unor glande foarte specializate în producerea uneia sau unui număr foarte mic de proteine în mari cantități. Celulele care constituie aceste glande sînt de obicei gigante și au nuclei mari sau uneori chiar mai mulți pentru aceeași celulă. Un asemenea sistem constituie un foarte bun model pentru analiza biochimică a diferențierii celulare. Lucrarea conține patru părți și anume : 1. *Diferențierea glandelor de mătase. Un sistem model pentru studierea acțiunii diferențiale a genelor* ; 2. *Coaja ouălor de insecte. Diferențierea proteinelor specifice și controlul sintezei și acumulării lor în decursul dezvoltării* ; 3. *Glandele salivare la Chironomus (Diptera) : Un sistem model pentru studiul diferențierii celulare* ; 4. *Modelul inelului Balbiani și activitățile biochimice în glandele salivare de Acricotopus lucidus (Chironomidae)*. În toate cele patru capitole problemele diferențierii sînt tratate la nivel molecular (cu referire la speciile de ARN, peptizi etc. care realizează procesul), subcelular (urmărind organitele în care au loc procesele), celular (urmărind evoluția celulei ca o consiecință a proceselor care au loc), fiziologic (urmărind evoluția moleculară a orgnitelor și a celulei în raport cu etapele vieții individului), și biochimic (căutînd să dubleze strict fiecare situație fiziologică cu un tablou metabolic pe cît posibil complet). Preocuparea pentru o corectă interpretare genetică a faptelor se face simțită pretutindeni ca una dintre ideile de bază ale lucrării. Fiecărui capitol îi urmează o foarte scurtă, dar concentrată, discuție care sintetizează principalele aspecte ale fenomenului discutat. De asemenea, fiecare capitol posedă o abundentă bibliografie reprezentînd de fapt, selectări bibliografice ale unor specialiști autorizați. Ori de cîte ori este posibil autorii recurg la reprezentări comparative dînd astfel expunerilor un caracter precis de discuție eficientă, la obiect. Un asemenea exemplu este : *Morfologia comparativă a corionurilor la insecte*, sau *Studii chimice comparative asupra corionului insectelor*. Cadrul biologic al desfășurării proceselor este marcat cu precizie și finețe în toate cazurile, așa fel încît problema diferențierii, desigur interesantă în sine, să-și dezvăluie întreaga semnificație pentru viața animalelor la care se manifestă. Lucrarea este un model de tratare științifică, corectă.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/5, *The visual system in vertebrates* (Sistemul vizual la vertebrate), Ed. de Frederick Crescitelli, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York. 1977, 813 p., 284 fig., 149, 60 $ U.S.

Apariția vederii a însemnat din punctul de vedere al adaptării organismelor la condițiile mediului, o achiziție de cea mai mare importanță și a determinat o adevărată revoluție în relațiile viețuitoarelor cu mediul. Actul vederii este însă de o asemenea complexitate încît chiar și numai din acest considerent și tot am fi obligați să admitem pentru formarea sa un lung și delicat proces de evoluție. Asemenea fenomen poate fi cunoscut, cel puțin în linii mari, numai cu prețul unor eforturi deosebite, și prezentarea lui ar presupune o activitate publicitară enormă. Singura alternativă rezonabilă rămîne prezentarea fenomenului vederii pe secvențe sistematice mai restrînse, făcînd firești punți de legătură necesare. În această idee volumul de față prezintă sistemul vizual la vertebrate încercînd să releve atît continuitățile cît și noutățile. Această necesitate este realizată pe mai multe căi dintre care prezentarea istoriei vertebratelor constituie conținutul primul capitol. Sînt de asemeni prezentate situații în care evoluția aparatului vizual se desfășoară altfel decît de obicei, adică, în sensul unei evoluții regresive, așa cum este cazul retinei la cyclostomi. Unele medii de viață de felul mediilor din profunzimile mărilor au determinat adaptări deosebit de interesante din al căror studiu se pot trage concluzii interesante asupra aparatului vizual, ceea ce se și face în cadrul capitolului privind adaptările la mediu din adîncul mărilor. Se prezintă adaptările evolutive ale peștilor, amfibiilor, șopîrlelor etc. unele cum ar fi broaștele țestoase bucurîndu-se de atenția specială a unui capitol amplu și bogat ilustrat. În toate aceste cazuri sînt prezentate nu numai evoluțiile anatomice ale aparatelor vizuale corespunzătoare dar totodată și evoluțiile speciilor chimice care constituie atît țesuturile din care sînt alcătuite aceste aparate, cît și mediatorii chimici ai vederii. Din acest punct de vedere, dar nu numai din acesta, volumul este și o lucrare de biologie comparată fiind deci important pentru numeroase categorii de specialiști. Aceeași optică încărcată de preocuparea pentru aspectul evolutiv al diferitelor organe și sisteme o regăsim și în capitolele privitoare la ochii păsărilor și adaptările lor sau la topografia vederii la mamiferele cu moduri de viață contrastante. În acest din urmă caz preocuparea pentru prezentarea comparativă a problemelor se manifestă în privința opticii comparative și a prezentării tot comparative a organizării retineene. Autorul manifestă o deosebită grije pentru utilizarea eficientă și rapidă a materialului volumul avînd în acest scop un index de autori și unul de subiecte. Reprezentările grafice sînt de asemenea un argument elocvent în acest sens și nu mai au nevoie pentru a fi pe deplin caracterizate decît de precizarea că sînt de cea mai bună calitate.

Mihai Zamfir-Grigorescu

R. E. LANGMAN ; W. KROBINGER ; P. C. HEINRICH, V. GROSS, W. NORTHEMANN și M. SCHEURLEN ; L. HÖSLI și E. HÖSLI, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (Referate de fiziologie, biochimie și farmacologie), Vol. 81, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 214 p., 41 fig. 43 00 $ U.S.

Volumul este format din patru părți cuprinzînd probleme de imunologie, farmacologie, biochimia acizilor nucleici și modelarea efectelor farmacodinamice în culturi de țesuturi. Acestea beneficiază fiecare de un tratament autonom exprimat prin existența unui plan propriu de expunere, adecvat specificului problemelor. Există totuși anumite trăsături comune manierei de tratare a subiectelor, ceea ce face ca volumul să fie unitar și lucrările să poată fi urmărite cu o anumită ușurință.

Prima parte intitulată *Imunitatea mediată celular și complexul major al histocompatibilității*, se ocupă cu așa-numita restricție H—2, un fenomen deosebit de mult studiat în ultima vreme și asupra căruia au apărut deja monografii de certă valoare. Efectul își are semnificația în procesul exprimării fenotipice a funcției citotoxice a limfocitelor T care lizează celulele țintă. Sînt prezentate modelele genetice implicate în procesul manifestării acestui efect și aceste modele sînt comentate din punct de vedere imunochimic. Procesul fiind suficient de complicat și totodată greu de cuantificat și descris autorul recurge la reprezentări grafice (scheme, modele, diagrame etc.) Totuși expunerea este clară și concisă, rezultatele fiind prezentate într-o discuție finală elegantă. Important, pentru cei în domeniu ; sînt prezentate chiar în text cele mai importante titluri ale unor lucrări de sinteză. Cea de-a doua lucrare *Sisteme alfa-adrenergice ca ținte pentru medicamente hipotensive*, se ocupă în principal cu efectele a două binecunoscute medica-

mente hipotensive : clonidina și alfa-metildopa. În fapt sînt discutate modul de acțiune și consecințele acțiunii acelor medicamente care analog clonidinei au două efecte paralele : stimularea directă a alfa-adrenoceptorilor și hipotensiunea.

Scopul este de a arăta că stimularea unor adrenoceptori centrali (alfa, evident) determină hipotensiunea. Compararea efectelor asupra alfa-adrenoceptorilor centrali și periferici sugerează autorului, printre altele, pentru noradrenalină un posibil rol de neurotransmițător central pentru reglarea cardiovasculară. *Structura și funcția compușilor ribonucleoproteici nucleari*, este o lucrare de fiziologie celulară și ca toate lucrările de acest fel, are un accentuat caracter de biochimie. După o scurtă introducere în care autorii arată importanța diferenței dintre eu- și prokariote la nivelul transcripției și implicit și importanța nucleoriboproteinelor nucleare, se trece la metodele de izolare iar apoi direct la studiul particolelor nucleare de ribonucleoproteine. Se prezintă apoi aspectele funcționale referitoare la aceste particule și evident și alterările acestor particole împreună cu consecințele lor. Lucrarea are o prezentare foarte condensată, expresivă și elegantă. *Acțiunea neurotransmițătorilor asupra și încorporare lor în culturi de țesuturi ale SNC*, este un studiu model cu profil de fiziologie și are așa cum este și firesc, un pronunțat caracter de biochimie și electrofiziologie, fiind în ambele privințe un model de co corectitudine, rigurozitate și finețe.

Mihai Zamfir-Grigorescu

CH. BAYLIS, B. M. BRENNER ; H. MEINHARDT ; W. BURKE și A. M. COLE, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (Referate de fiziologie, biochimie și farmacologie), Vol. 80, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 1978, 197 p., 44 fig, 39,60 $ U.S,

Profilul acestui volum este în mod cert nu de fiziologie, biochimie și farmacologie, ci numai de fiziologie, cele trei lucrări (și totodată părți componente) avînd numai subiecte din acest domeniu. În ordinea prezentării lor ele sînt : *Determinanți fiziologici ai ultrafiltrării glomerulare*, *Modele pentru dezvoltarea ontogenetică a organismelor superioare* și *Influențe extraretinale asupra nucleului geniculat lateral*. Volumul mai conține și un index cumulativ de autori și de subiecte începînd de la volumul 50 al acestei serii. În prima lucrare autorii analizează factorii care influențează ultrafiltrarea glomerulară în diferite situații Punctul de vedere fiziologic este cel mai bine ilustrat de următoarea situație care ni se pare tipică : autorii se referă în majoritatea situațiilor la debitul defiltrare glomerulară al unui singur nefron (SNGFR-single nephron glomerular filtration rate, nl/min.), adică al unității funcționale renale. Fenomenul ultrafiltrării glomerulare, astfel urmărit la nivel celular, este prezentat în mai multe situații cea de referință fiind la animalele normale. Este apoi prezentată ultrafiltrarea glomerulară în cazul unor variații selective ale unor parametri, cum ar fi : debitul plasmatic glomerular inițial, diferența presiunii hidraulice glomerulare transcapilare, coeficientul de ultrafiltrare, concentrația proteică aferentă etc. Autoreglarea, efectele diverșilor hormoni și ale medicamentelor vasoconstrictoare, controlul SNGFR la nou născuți și efectele afecțiunilor renale asupra SNGFR sînt aspectele cele mai importante pe care este absolut necesar să le amintim dacă vrem să avem o imagine cît de cît completă a felului în care autorii epuizează problema. Scurtul dar foarte folositorul glosar de la început și bine selecționata bibliografie care încheie lucrarea, ne dau măsura calității deosebite a lucrării. Cea de-a doua lucrare cu un profil mai amplu și cu implicații largi pentru biologia generală, își dezvoltă conținutul pe mai multe direcții dintre care putem menționa ca mai importante : generarea structurilor prin autocataliză și inhibiție laterală, controlul formării cîtorva structuri printr-un gradient morfogen, tipul recursiv al formării modelelor, izolarea activatorilor și inhibitorilor, concepte embriologice în sensul teoriei propuse etc. Concluziile, foarte reținute, și bibliografia, abundentă, sînt elementele în care putem recunoaște cu ușurință seriozitatea preocupării cu care autorul ia în discuție problemele alese. De altfel, trebuie să insistăm asupra faptului că autorul face o prezentare deosebit de unitară și cu foarte multe elemente de cuantificare. Cea de-a treia lucrare este o lucrare tipică de neurofiziologie și privește anumite aspecte ceva mai particulare ale fenomenului vederii. Deși foarte concentrată lucrarea nu omite nimic din ceea ce este esențial în tratarea acestei probleme. Sînt prezentate toate structurile dintre ochi și cortexul vizual și totodată și fenomenele care se desfășoară la nivelul acestor structuri. Accentul se pune pe nucleul geniculat lateral. Situațiile fiziologice mai importante (somn, veghe etc.) sînt prezentate cu referire la structura amintită și bine-înțeles că autorii nu uită să prezinte nici evoluția mediatorilor chimici în cursul proceselor fiziologice prezentate. O remarcă specială trebuie făcută în privința prezentării care este uneori un excelent exemplu de modelare.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Writing a scientific paper (*Cum să scriem o lucrare ştiinţifică*) de Vernon Booth, Publicată de Societatea de Biochimie (Londra) cu permisiunea societăţii Koch-Light Laboratories Ltd, 1977, 32 p., 1,0 £.

Timpul nostru este caracterizat printr-o mare producţie de lucrări ştiinţifice, fiind probabil vremea unor acumulări cantitative masive sau altfel spus prevestirea unor viitoare cristalizări teoretice. Acest fapt, indiferent ce interpretare i-am da, are însă o consecinţă de mare importanţă practică, dar din păcate restrictivă-îngreunarea comunicaţiei ştiinţifice şi implicit a sintezelor de date. Cercetătorul obişnuit este confruntat inevitabil cu problema spinoasă a unei informări exhaustive şi rapide, singura cale de realizare a unei munci eficiente şi de bună calitate. Această problemă a cercetătorilor din întreaga lume nu poate fi însă rezolvată decît prin eforturile lor, în calitatea de producători de informaţie ştiinţifică. De felul în care ei vor putea să extragă din faptul experimental informaţia ştiinţifică şi să o prezinte în mod adecvat depinde în ultimă instanţă şi posibilitatea folosirii rapide a rezultatelor. Desigur că mulţi izbutesc să realizeze acest lucru însă preţul este aproape întotdeauna o experienţă personală al cărei echivalent în timp ridică în mod firesc problema economicităţii. Soluţia ar fi ca cineva să-şi ia sarcina de a comnica celorlalţi experienţa sa în această privinţă. Omul acesta este Vernon Booth a cărui lucrare a răspuns tocmai acestei delicate întrebări : cum să scriem o lucrare ştiinţifică ?. Lucrarea cuprinde recomandări concrete asupra formei grafice, stilului, bibliografiei, unităţilor de măsură, punctuaţiei şi chiar asupra atitudinii posibililor autori faţă de rezultatele proprii. Deşi scurtă această lucrare izbuteşte să răspundă sarcinii pe care şi-a asumat-o autorul.

Mihai Zamfir-Grigorescu

HELGA SCHRÖDER, *Mikrobiologisches Praktikum* (Indrumător practic de microbiologie) Volk und Wissen Volkseigener Verlag. Berlin, 1977, 220 p., 200 fig. 9,0 M, DDR

Volumul de faţă este un manual de lucrări practice de microbiologie pentru studenţi şi conţine toate elementele necesare pentru deprinderea celor mai frecvente manevre practice întîlnite în cadrul unui laborator de microbiologie. Manualul conţine, în afara unor recomandări generale, descrierea în amănunt a tehnicilor de lucru particulare adecvate unor categorii mai deosebite de microorganisme cum ar fi spre exemplu viruşii. Sînt prezentate metode pentru cultura, separarea şi identificarea diferitelor microorganisme, precum şi posibilităţile de verificare a felului cum s-au realizat acestea. Evidenţierea unor principii active şi separarea lor sînt prezentate în anumite capitole speciale în care se face apel şi la unele tehnici deopotrivă moderne şi expeditive ca de exemplu cromatografia pentru antibiotice. Cu toate că acest manual se intitulează practic el nu este lipsit de preocupări teoretice, majoritatea metodelor avînd ca finalitate practică tocmai obţinerea unor rezultate cu precise semnificaţii teoretie. În plus principiile teoretice ale metodelor sînt întotdeauna primul punct al prezentării oricărei metode. Aceste principii se prezintă în mod concis şi, ceea ce este mai important, la nivelul ultimelor achiziţii teoretice din domeniul respectiv. Materialul ilustrativ este schematizat la maximum fiind foarte sugestiv. Prezentarea este metodică mergînd pînă la ultimele detalii posibile de felul exemplelor de notare a rezultatelor. Formulele folosite sînt întotdeauna explicate iar prepararea reactivilor este precizată în termenii cei mai riguroşi ai chimiei. Manualul îşi atinge scopul în mod desăvîrşit.

Mihai Zamfir-Grigorescu

ROLF K. FREIER, *Aqueous solutions. Data for inorganic and organic compounds* (Soluţii apoase. Date asupra compuşilor anorganici şi organici), Vol. 1, Editura Walter de Gruyter, Berlin. New York 1976, 440 p.

Deşi nu întrutotul adevărat, proverbul „nu este reacţie unde nu este soluţie", s-a dovedit a conţine o mare doză de adevăr, în sensul că cele mai frecvente reacţii care au loc în natură sînt reacţii în soluţii, de obicei apoase. Ar fi nepotrivit să ignorăm reacţiile în topituri sau în fază gazoasă. Ele, în afara faptului absolut evident, şi prin urmare incontestabil, că există, îşi au rolul lor bine determinat în natură şi constituie calea de desfăşurare a unor procese caracteristice

vulcanice și atmosferice care au loc pe planeta noastră. Prezența apei pe pămînt este unul dintre factorii fără de care viața, în general, ar fi un nonsens, iar cea a societății umane încă și mai mult. Este deosebit de greu, dacă nu chiar imposibil, să credem că chimia (ca știință și industrie) căreia omenirea îi este așa de îndatorată, ar fi putut exista în afara reacțiilor în soluții apoasă. De fapt chiar și acum. în zilele noastre, cînd sinteza oragnică folosește solvenții neapoși, apa continuă să condiționeze dezvoltarea industriei chimice și a multor altor industrii. Este de prisos să mai adăugăn că activitatea oricărui laborator implică utilizarea acestui excelent solvent care este apa. Acest fapt face ca literatura să abunde în date asupra soluțiilor apoase, ceea ce este de înțeles, dar nu poate constitui un avantaj foarte mare pentru cel interesat de aceste date întrucît dispersia lor face manevrarea, și în general accesul la ele, o chestiune delicată de timp. Concentrarea lor într-un singur volum, ca cel de față, aceasta este de fapt soluția chestiunii, și din acest punct de vedere volumul răspunde unei foarte stringente necesități. Astfel, se poate spune fără șanse de a greși că oricare compus uzual își găsește în aceste tabele, în afara altor date, cel puțin, solubilitățile și potențialul redox. Trebuie să precizăm că este vorba atît de compuși anorganici cît și organici. Volumul are un scurt capitol preliminar intitulat „Instrucțiuni de folosire", care așa cum îl arată și numele, orientază cititorul asupra folosirii tabelelor conținînd totodată și sistemul de abreviații întrebuințat. În același scop volumul conține și un „Vocabular" care include termenii cei mai frecvenți și semnificativi. Ca și primul capitol și acesta este bilingv (anglo-german) ceea ce ridică mult valoarea volumului prin mărirea și pe această cale a posibilităților de întrebuințare. Autorul face precizarea că datele din aceste tabele reflectă situația literaturii actuale, calitatea datelor fiind garantată de sursele din care provin. Volumul conține în încheiere un index de substanțe (de fapt două : unul pentru substanțe organice și unul pentru substanțe anorganice) și în plus un index de formule chimice ale compușilor organici. Ar trebui să mai adăugăm că în afara numărului mare de compuși conținuți, volumul are și calitatea unei prezentări grafice excelente ceea ce face din el un instrument practic și elegant la îndemîna chimistului și în general a tuturor celor care lucrează în laborator.

Mihai Zamfir-Grigorescu

ROLF K. FREIER, *Aqueous solutions. Data for inorganic and organic compounds. Suplimente* Soluții apoase. Date asupra compușilor anorganici și organici. Suplimente), Vol. II, Editura WALTER de Gruyter, Berlin. New York, 1976, 477 p.

Acest volum subintitulat și *Suplimente* se referă la acei compuși, marcați în primul volum cu un asterix, și care datorită faptului că au constituit obiectul unor lucrări deosebite, au ajuns la situația de a fi fost necesar să li se determine mai multe constante. Acestea au fost apoi extrase din literatură și grupate de autor în acest volum cu scopul de a putea constitui un corp unitar și ușor manevrabil. Volumul este prin urmare continuarea organică a primului și împreună cu acela constituie de fapt, o unitate funcțională. În acest volum se găsesc o serie de constante (tabelate sau reprezentate grafic), ecuații chimice (cu efectele lor calorice sau de altă natură) sau dependența constantelor anumitor substanțe de anumiți factori (cum ar fi ionizarea funcție de temperatură) sub forma unor formule (cele mai multe empirice sau de factori de coreție empirici). Trebuie să facem constatarea că autorul a operat o selecție riguroasă, reținînd pentru acest volum de constante suplimentare acei compuși care sînt mai importanți și care prin situația lor particulară nu admit un tratament general provenit din aplicarea anumitor formule la datele lor particulare. Asemenea exemple sînt acidul ortoboric și monoxidul de carbon. Sînt de asemeni prezentați compuși mai deosebiți deși nu de o foarte mare frecvență și utilizare cum ar fi dioxidul de clor și heptoxidul de clor. Uneori sînt prezentate date referitoare la unele perechi de ioni de mare importanță în natură, cum ar fi Cu^{+}/Cu^{+2} sau F^{+2}/F^{+3}. Deosebit de amplu este tratată apa și omologul ei izotopic apa grea, fiindu-le prezentate un foarte mare număr de constante și parametri fizici. Dintre datele prezentate, în legătură cu anumite procese fizice, sînt prezentate datele implicate într-unele procese naturale mai complexe cum ar fi precipitațiile atmosferice. Acestora li se consideră un asemenea număr de factori încît capitolul poate constitui o bază de lucru, în particular de calcul, pentru cei interesați în studiul precipitațiilor atmosferice (de exemplu pentru meteorologi sau cei care lucrează în domeniul fizicii atmosferice). Cele mai importante mărimi cum ar fi constanta dielectrică, (pentru apă ca atare precum și pentru filmele apoase), vîscozitatea dinamică, tensiunea superficială, structura gheții (cu modificările ei), etc., sînt privite în corelație cu unii factori, de multe ori în mod dinamic, ajungîndu-se la diagrame, grafice, formule etc., ceea ce înlesnește mult înțelegerea unor fenomene. În sfîrșit ținuta grafică deosebit de îngrijită, fac din acest volum un prețios mijloc de lucru.

Mihai Zamfir-Grigorescu

W. ARBER, W. HENLE, P. H. HOFSCHNEIDER, J. H. HUMPHREV, J. KLEIN, P. KOLDOVSKY, H. KOPROVSKY, O. MAALOE, F. MELCHERS, R. ROTT, H. G. SCHWEIGER, L. SYRUCEK şi P. K. VOGT, *Current topics in microbiology and immunology* (Probleme curente în microbiologie şi imunologie), vol. 78, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 250 p., 45 fig., 43 $ U.S.

În acest volum sunt expuse, într-o foarte bună sistematizare un număr de 8 publicaţii. Un grup de 3 lucrări se ocupă de bacteriofagul lambda. Prima, intitulată : *Structura şi asamblarea bacteriofagului lambda* conţine un bogat material ilustrativ alcătuit din 5 tabele cu date fizice şi proprietăţi ale părţilor componente ale bacteriofagului, 11 figuri constituite din imagini obţinute la microscopul electronic şi 9 scheme sugestive asupra structurii şi asamblării bacteriofagului lambda, se dau detalii amănunţite asupra asamblării părţilor componente. Următoarea lucrare : *Sinteza şi scindarea bacteriofagului* λ, împărţită în 6 capitole, tratează mai întîi două aspecte particulare care se referă la genele Int şi Xis asupra cărora se fac studii genetice, fiziologice şi biochimice. Aspectele generale se referă la zonele specifice în care are loc legarea şi la procesele de sinteză şi de scindare privite ca reacţii biochimice. Următoarea lucrare din acest grup : *Redublicarea ADN-ului-Bacteriofagul* λ rezumă datele de bază existente pînă în acest moment referitoare la replicarea λ ADN, punînd accent în deosebi pe replicarea timpurie şi pe cea tîrzie. Celelalte lucrări ţin tot de domeniul microbiologiei. Vom începe cu : *Viruşi papilomatoşi umani şi rolul lor posibil în celulele canceroase descuamante* în care se indică tipurile de viruşi papilomatoşi umani, se face caracterizarea lor care se referă la compoziţia în aminoacizi, la proteinele existente, la răspunsul imun faţă de infecţiile cu viruşi, preum şi la căile de transmitere a virusilor. În continuare urmează o amplă clasificare a diferitelor tipuri de viruşi papilomatoşi care induc conversia malignă şi în încheiere se discută probabilităţile de producere a cancerului de către virusii studiaţi. Lucrarea : *Infecţii virale dobîndite perinatal* este de fapt o clasificare a infecţiilor virale de acest tip. În lucrarea : *Clonarea genelor cu plasmide mici* sînt discutate la început, pe larg, atît argumentele teoretice cît şi metodologia clonării. Urmează apoi o caracterizare a plasmidelor importante pentru utilizarea lor în clonare pe baza proprietăţilor specifice şi se indică modul de obţinere al ADN-ului specific, necesar clonării. În încheiere se dau îndrumări asupra măsurilor necesare de protecţie în cazul experienţelor de clonare. O ultimă lucrare : *Structura şi funcţia genomului virusilor care conţin ARN monocatenar ca material genetic. Conceptul transcripţiei şi translaţiei helix-urilor şi clasificarea acestor viruşi în şase grupe* abordează mai mult aspectele teoretice ale problemei, iar în final se fac consideraţii asupra distribuţiei virusilor în grupele I—VI. Domeniul imunologiei este reprezentat prin lucrarea : *Interacţiunea antigen-receptor şi inducerea toleranţei la limfocitul B* îşi dezvoltă conţinutul pe mai multe direcţii, dintre care putem menţiona problema receptorilor antigenici de pe limfocite. Un capitol amplu este consacrat modelelor folosite pentru inducerea toleranţei la limfocitul B. Fiecare lucrare este completată cu o bibliografie vastă.

Corina Mihail

W. ARBER, W. HENLE, P. H. HOFSCHNEIDER, J. H. HUMPHREY, J. KLEIN, P. KOLDOVSKY, H. KOPROWSKI, O. MAALOE, F. MELCHERS, R. ROTT, H. G. SCHWEIGER, L. SYRUCEK, P. K. VOGT, *Current topics in microbiology and immunology* (Probleme curente în microbiologie şi imunologie), Vol. 79, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 312 p., 35 fig., 49 $ U.S.

Acest volum se ocupă în principal de viruşii ARN tumorali de tip C. În prima lucrare intitulată *Expresia virusilor ARN tumorali la nivelul translaţiei şi transcripţiei*, se ia în discuţie fenomenul reglării expresiei ARN-ului exogen şi endogen în celulele infectate şi neinfectate, care are loc la nivelul sintezei proteinei virale şi a ARN-ului. Accentul se pune pe sinteza ARN specific viral. Ca modele de studiu au fost folosiţi viruşii tumorali aviari sau murinic de tip C. Un studiu mai aprofundat al acestor viruşi este cuprins în lucrarea : *Fingerprintul oligonucleotidului din viruşii ARN tumorali* care constă din caracterizarea structurii genomului virusilor ARN tumorali cu ajutorul tehnicii fingerprint (tehnica amprentelor) aplicată oligonucleotidului din ARN viral. Tehnica de secvenţialitate a condus la determinarea relaţiilor genetice între viruşi, genomul viral a fost clasificat şi reprezentat pe hărţi peptidice, permiţînd astfel şi studii asupra recombinării sale. Un aspect mai special al problemei este abordat în articolul : *Viruşi*

xenotropici de tip C, de fapt un vast material de studiu din care spicuim : clasificarea virușilor endogeni de tip C la șoarece, descoperirea virușilor xenotropici la șoarece, analize de detectare, infectarea cu viruși, caracterizarea, inducerea virusului xenotropic la șoarece. Se remarcă un bogat material ilustrativ alcătuit din 7 figuri și 20 tabele. Un aport nu mai puțin interesant îl aduce lucrarea : *Viruși de tip C la șoareci sălbatici : Caracterizarea și istoria naturală a virusului murinic leucemic viral (MuLV) amfotropic, ecotropic și xenotropic.* Studiul pe șoareci sălbatici s-a dovedit util deoarece ei ar putea reprezenta, într-o oarecare măsură, un artefact în încrucișarea selectivă a animalelor de laborator. Experiențele au evidențiat existența unor populații de viruși (amfotropici, ecotropici și xenotropici) cu proprietăți distincte in vitro și cu patogeneză distinctă in vivo. Printre aceste populații de șoareci sălbatici au fost găsite unele cu capacitate de expresie scăzută și altele cu capacitate de expresie ridicată. Se face apoi o amplă trecere în revistă a istoriei naturale a virușilor de tip C la șoareci sălbatici, din care amintim : transmiterea naturală a virușilor, paralizia imunologică, patologia și patogenia limfoamelor spontane. Următoarele 2 lucrări tratează despre virușii ARN tumorali la păsări. În prima lucrare : *Mutanți termosensibili ai virușilor ARN tumorali la păsări : O privire generală* se arată că pentru fiecare element genetic al sarcomului viral aviar, s-a identificat cel puțin un mutant sensibil la temperatură. Mutanți termosensibili (clasa T) pot fi denumiți acei mutanți care, suferind o transformare anormală, produc o leziune ce poate fi răspunzătoare de interdicția unora sau a tuturor parametrilor de transformrre în celula infectată, deși replicarea virusului nu este afectată. Sînt indicați apoi parametrii care măsoară transformarea. O transformare anormală impică și o replicare anormală a mutanților. Cunoaștrea mai detailată a proteinelor structurale virale și enzimatice, permite o clasificare și o înțelegere mai aprofundată a acestor mutanți. În lucrarea : „Mecanism pentru recombinarea genetică a retrovirușilor la păsări" se face discutarea, în contextul datelor experimentale directe, a mecanismelor posibile implicate în generarea unei frecvențe ridicate a virusului recombinat, observate după coinfecția celulelor cu 2 retroviruși aviari diferiți genetic. Se discută și mecanismele genetice pentru recombinare. O lucrare cu un caracter mai aparte se intitulează : *Progrese în studiile care se referă la etiologia și diagnosticul serologic al leucozei enzootice bovine.* Leucoza enzootică constituie o problemă de un interes economic major pentru fermele zootehnice. Această lucrare constuituie o încercare de a rezuma cunoștințele obținute în acest domeniu pînă în 1969 referitoare la proprietățile biochimice, biologice, morfologice și genetice ale particulelor de tip C bovin și folosirea lor în diagnosticul serologic (prin teste ca imunodifuzia în gel de agar, fixarea complementului, imunofluorescența etc.) al leucozei bovine. Toate lucrările posedă un bogat material bibliografic ceea ce constituie un ajutor prețios pentru laboratoarele de specialitate.

Corina Mihail

N. REHFELD și D. REICHELT, *Analytische und praparative Methoden der Klinischen Biochemie* (Metode analitice și preparative în biochimia clinică Berlin 496 p. 1977

Dezvoltarea impetuoasă a metodelor fizicochimice de analiză din ultimii 20 ani a făcut ca științele biologice în general și biochimia în partiular să facă progrese uriașe. Biochimia clinică a avut, cum era și firesc, mult de cișigat de pe urma acestor cuceriri ale tehnicii de analiză de laborator. Cunoașterea temeinică de către biochimistul clinician a noțiunilor teoretice care stau la baza metodelor fizico-chimice de analiză este o garanție că acesta va putea, la rîndul său, să îmbogățească arsenalul mijloacelor de investigație biochimică medicală.

Meritul cărții de față este de-a fi făcut o prezentare amănunțită, fără a obosi însă pe cititor cu prea multe detalii, a tuturor tehnicilor de separare, purificare și caracterizare a produșilor de interes biologic. Astfel, se trec în revistă toate metodele cromatografice, electroforetice precum și a celor de fracționare a compușilor macromoleculari prin precipitații cu săruri, solvenți organici etc.

În capitolul rezervat metodelor analitice se trec în revistă tehnicile optice de analiză ca de ex., spectrofotometria de absorbție și emisie, nefelometria, polarimetria etc., apoi cele de pH-metrie și polarografie. Dintre metodele analitice de mare valoare pentru laboratorul clinic discutate în carte mai semnalăm tehnicile imunologice și radioimunologice precum și cele care implică enzimele. Este bine cunoscut faptul că în reacțiile catalizate de enzime se poate determina fie activitatea enzimei fie concentrația unuia din produșii de reacție. Autorii discută în secțiunea dedicată analizei enzimatice atît măsurarea activității diferitelor enzime de interes clinic cît și

dozarea unor compuși ca ATP, uree, amoniac, glucoză, NAD, glutation etc. Cartea se încheie cu o scurtă privire asupra metodelor de determinare a structurii și compoziției proteinelor.

Prin conținutul ei, prezenta carte va fi de un real folos biochimiștilor din laboratorul clinic și studenților din biologie și medicină.

Ștefan Hulea

C. J. GRAY, *Mechanismen der Enzymkatalyse* (Mecanismul catalizei enzimatice) Akedamie Verlag, Berlin 383 p. 1976

Marile descoperiri din biologie din ultimul timp au permis o mai bună înțelegere la nivel molecular a proceselor dinamice din materia vie. Conlucrarea dintre chimistul organician și biolog a dus la cunoașterea în detaliu a multor mecanisme de cataliză enzimatică și deci la posibilitatea stabilirii unor corelații între diferite lanțuri metabolice și procese celulare.

Unul din scopurile majore ale acestei cărți este crearea unei punți de legătură între științele biologice și chimie ca să arate biologilor că binecunoscutele enzime urmează principiile de bază ale chimiei organice și să demonstreze chimiștilor organicieni că cunoștințele asupra felului de-a reacționa al complexelor macromolecule, de care depinde procesul vieții, sînt preluate din studiul biologic. De aceea, cartea de față se adresează în primul rînd biochimiștilor și chimiștilor precum și studenților acestor discipline.

Primul capitol introduce pe cititor în cîteva principii de bază ale teoriei mecanismelor de cataliză în chimia compușilor organici precum și unele aspecte de termodinamică. În capitolul 2 se descriu noțiunile de bază ale catalizei enzimatice și acestea constituie o bază de plecare pentru expunerea detaliată din capitolele următoare. Astfel, în capitolele 3—8 autorul tratează sistematic mecanismele reacțiilor catalizate de principalele clase de enzime și anume : oxidoreductaze, hidrolaze, enzimele care catalizează transferul unei grupări (amino, metil, fosfat,etc.), liaze, izomeraze și ligaze. Cartea se încheie cu o discuție asupra naturii catalizei enzimatice.

Ștefan Hulea

Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 25. Advanced Methods in Protein Sequence Determination (Biologie moleculară, biochimie și biofizică 25. Metode avansate de determinare a secvenței proteinelor) editată de S. B. Needleman, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg — — New York, 1977, 185 pg., 97 fig., 19 tab., 477 ind. bibl.

Cartea introduce cititorul în folosirea metodelor moderne de determinare a structurii proteice. Astfel sînt prezentate metodele de cuplare, de degradare a peptidelor legate de suporturi solide, și determinarea secvenței peptidelor și proteinelor fără grupări aminice libere. De un deosebit interes este folosirea anticorpilor la studiul structurii proteice. Pentru determinarea secvenței proteinelor, peptidelor și aminoacizilor sînt prezentate, de asemeni, tehnicile : cristalografia cu raze X, tehnica luminii polarizate, a spectrometriei de masă și a rezonanței magnetice nucleare.

Capitolele cărții aduc un aport valoros atît din punct de vedere metodologic cît și fundamental prin multitudinea de date (tabele și figuri) referitoare la structura și secvența unor proteine, peptide și enzime. Volumul este de un real folos pentru specialiști în biologie moleculară, biochimie și biofizică.

Natalia Moldoveanu

Lecture notes in biomathematics, vol. 18, editor S. Levin ; *Mathematics and the life sciences* (Matematica și științele biologice), editor D. E. Mathews ; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 385 p.

Volumul 18 din seria *Note de curs în biomatematică* cuprinde o selecție de conferințe ținute la Congresul canadian de matematică, ce a avut loc la Sherbrooke, în august, 1975. Tematica congresului a fost axată pe impactul matematicii în biologie, avînd ca scop încurajarea co-

operării și schimburilor între matematicieni, biologi și medici. Astfel, șase specialiști au prezentat cîte cinci conferințe fiecare, luînd în discuție diferite aspecte ale interacției dintre matematică, biologie și medicină. Aceste conferințe au fost comentate în cadrul unui seminar la care au participat cercetători din domeniul fiziologiei, epidemologiei, biologiei populațiilor, biologiei dezvoltării etc.

Contribuțiile conferențiarilor invitați sînt publicate, după cum am spus, în volumul de față. Cele mai multe au tratat problema construirii modelelor matematice și a căilor de verificare a lor, în biologie și medicină. G. A. Barnard a prezentat o conferință privind instrumentul statistic în științele biologice. D. J. Finney a susținut o foarte interesantă prelegere asupra experimentului biologic. Conferința prof. R. Levin asupra analizei calitative a sistemelor complexe ca și cea a prof. J. Maynard Smith, privind modelele matematice în biologia populațiilor sînt de un interes deosebit mai ales pentru ecologi. Prof. R. Rosen a susținut o serie de conferințe pe tema generării și recunoașterii formelor și căilor, așa cum apar ele în evoluția și dezvoltarea biologică. În sfîrșit prof. A.E.R. Woodcock a susținut o conferință privind teoria catastrofelor și modelarea în biologie, cu aplicație în transmiterea impulsului nervos.

Din cele de mai sus reiese clară oportunitarea volumului pentru cei ce lucrează în domeniul, atît de complex și insuficient investigat, al biomatematicii.

C. Mușolan

R. KELLER, *Immunologie und Immunopatologie* (Imunologie și imunopatologie), Georg Thieme Verlag, Sttuttgart, 1977, 206 p., 31 fig., 12 tabl.

Lucrarea se adresează în special medicilor și biologilor care doresc să se informeze asupra bazelor imunologiei. Meritul autorului este acela de a fi selectat și prezentat într-o formă unitară variatele probleme cu care se confruntă azi imunologia, oferindu-ne o introducere în acest domeniu devenit o ramură importantă a științelor biologice. După o trecere în revistă a mecanismelor nespecifice de apărare, autorul analizează sistematic componentele principale ale reacțiilor imune specifice ca de exemplu diferențierea limfocitelor, structura și proprietățile imunoglobulinelor, reacția dintre antigen și anticorp, reactivitatea imună și toleranța. În capitolele dedicate problemelor de imunopatologie sînt trecute în revistă imunodeficiențele, neoplaziile limforeticulare, reacțiile de hipersensibilitate și bolile autoimune. Bazele imunologice ale transplantului de organe și imunitatea tumorală încheie lucrarea.

Expunerea clară, însoțită de figuri și tabele sugestive, ușurează înțelegerea problemelor complexe de imunologie. Referirile continue la semnificația pentru clinică și practica medicală, în general, a cunoștințelor de imunologie îl conving odată în plus pe cititor că imunologia a devenit o ramură importantă a medicinii. Indicațiile bibliografice selective cît și glosarul alcătuit de autor incită pe lector la lărgirea cunoștințelor de bază de imunologie pe care cartea le oferă ca o primă etapă a abordării acestui domeniu.

Doina Onică

Advances in Biochemical Enginering (editori T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough), vol. 8; *Mass transfer in biotechnology* (Transferul de masă în biotehnologie) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 151 p., 95 fig., $ 29.

Cel de-al optulea volum din seria *Progrese in ingineria biochimică* aduce noi contribuții la interesantul material prezentat deja în volumele apărute anterior în această serie. El este axat pe problema transferului de masă în biotehnologie și cuprinde trei referate generale: *Aspecte tehnice ale proprietăților reologice ale culturilor microbiene* (M. Charles); *Aplicațiile bioreactoarelor turn în producția de biomasă* (K. Schügerl, J. Lücke, J. Lehmann, F. Wagner); *Caracteristicile de sorbție ale contactului gaz-lichid în vasele de amestecare* (M. Zlokarnik).

Primul referat se ocupă de un aspect oarecum neglijat în biotehnologie, în ciuda importanței lui, și anume caracteristicile reologice ale lichidelor de cultură și efectele acestora asupra bioproceselor. Aceste efecte sînt atît de multiple și de profunde — după cum demonstrează autorul — încît proiectarea noii generații de fermentatoare trebuie să țină obligatoriu seama de fenomenele reologice. Referatul este structurat pe nouă capitole, dintre care trei sînt de interes general, iar celelalte șase se ocupă de fenomenele reologice specifice întîlnite în bioinginerie.

Al doilea referat prezintă aplicațiile bioreactoarelor turn în producția de biomasă; acest referat este de fapt o continuare a celui prezentat de doi din autori în volumul precedent al seriei *Progrese în ingineria biochimică*. Referatul pune în discuție posibilitate utilizării reactoarelor turn în producția industrială de biomasă, cunoscute fiind avantajele acestor tipuri de reactoare, care asigură o mare viteză de transfer a oxigenului, precum și un scăzut consum de energie. Autorii își prezintă propriile rezultate obținute în diferite variante experimentale utilizînd drept substrat atît medii sintetice, cît și medii complexe.

Ultimul referat se ocupă de o problemă foarte importantă pentru biotehnologie, și anume transferul de masă între faza gazoasă și faza lichidă în așa-numitul procedeu de contact gaz-lichid, realizat prin agitarea vaselor de amestecare. Autorul prezintă două metode noi de determinare a vitezelor de absorbție atît pentru apa pură, cît și pentru soluții saline. Concluziile autorului, coroborate cu datele bibliografice, recomandă anumite tipuri de agitatoare, în funcție de concentrația și — mai ales — viscozitatea mediului de cultură.

Cele de mai sus atestă importanța volumului de față pentru cei interesați de problemele acestei științe atît de actuale și profund interdisciplinare — ingineria biochimică.

Constanța Mușolan

G. HABERMEHL, *Gift-tiere und ihre Waffen* (Animale otrăvitoare și armele lor), ediția a 2-a, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 150 p., 21 tab., 36 fig., $ 10,50.

Ediția a doua a cărții *Animale otrăvitoare și armele lor* este o formă revizuită și îmbogățită față de cea apărută în 1976. Apariția celor două ediții la intervale atît de scurte demonstrează buna primire de către cititori a acestui mic volum, al cărui merit esențial constă în valoarea sa practică (dealtfel, cartea se subintitulează *Ghid pentru turiști*). Caracterul de popularizare al cărții nu afectează rigoarea științifică, autorul selecționînd cu mult discernămînt noțiunile fundamentale privind biologia animalelor otrăvitoare, răspîndirea lor geografică (reprezentată pe hărți, diagrame, etc.) biochimia și chimia secreților toxice etc.

Materialul, foarte documentat și concis al cărții, este completat cu un capitol privind aplicațiile terapeutice ale toxinelor animale, cu sfaturi pentru amatorii de terarii și chiar cu o listă a institutelor din lume ce prepară vaccinuri antitoxine animale.

În ansamblul ei cartea oferă o lectură instructivă nu numai pentru medici, biologi, chimiști, ci pentru o masă foarte largă de cititori.

Constanța Mușolan

Encyclopedia of Plant Physiology (new Series) vol. 4, *Physiological Plant Pathology* (Fitopatologie fiziologică), editată de R. Heitefuss și P. H. Williams, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 92 fig., 890 p., 1976, 194 DM.

Noua serie a *Enciclopediei de fiziologie vegetală* consacră cel de-al patrulea volum fitopatologiei fiziologice. Încă din primele rînduri ale prefației, editorii volumului fac distincția între patologie și patologie fiziologică, subliniind faptul că aceasta din urmă cuprinde acele domenii ale patologiei care au ca obiect activitățile fiziologice și biochimice ale patogenilor și răspunsul țesutului vegetal gazdă.

Cartea este structurată pe capitole care urmăresc întreaga secvență a interacțiilor gazdă — patogen, înainte și în timpul patogenezei, ducînd în ultimă instanță la rezistența sau susceptibilitatea plantei față de agentul respectiv. Astfel, procesele anterioare infecției propriu-zise — germinarea sporilor și penetrația — procese ce se desfășoară în rizosferă sau filosferă sînt discutate în două din capitolele cărții.

Dintre agenții patogeni, fungii și bacteriile formează subiectul preponderent al cărții; totuși, există o serie de referiri și la alți agenți ca virușii, nematodele sau micoplasmele.

Fenomenele de patogeneză sînt abordate în toată complexitatea lor: modificarea metabolismului normal al plantei, a balanței apei sau a creșterii, corelația între aceste fenomene și nivelul toxinelor, enzimelor sau al factorilor de creștere.

Dată fiind importanța acordată mecanismelor de inducere a rezistenței față de patogeni sau a specificității relației parazit gazdă, editorii au inclus în prezentul volum cîteva capitole

privind determinanții de rezistență sau de specificitate de răspuns, preexistenți sau induși în planta atacată. În strînsă legătură cu acesta, se discută baza genetică a specificității și rolul reglării metabolice în fenomenele de patogeneză.

Editorii au considerat necesar ca un capitol special să se ocupe de factorii ce pot predispune planta la îmbolnăvire, întrucît acest aspect este destul de des neglijat de fitopatologi.

De asemenea, autorii au inclus în volum și un capitol — foarte important metodologic — privind experiențele de parazitism pe calusul gazdă.

Din cele de mai sus, reiese clară valoarea științifică a acestui volum de fitopatologie fiziologică. Ideea generală, subliniată de diferiții autori în capitolele cărții este că rezolvarea problemelor de fitopatologie, cu toate implicațiile sociale și științifice, reclamă contribuția tot mai activă a fiziologilor și biochimiștilor.

Constanța Mușolan

Lecture notes in biomathematics, vol. 14, editor S. Levin ; *Diffusion processes and related topics in biology* (Procese de difuzie și alte aspecte corelate în biologie) de Luigi M. Ricciardi ; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 200 p.

După cum se știe, editura Springer a inițiat în 1974 o nouă serie interdisciplinară *Note de curs în Biomatematică*, serie care se află acum la al 14-lea volum. Pentru cei interesați, amintim că în această serie au apărut volume care abordează din punct de vedere matematic probleme de epidemiologie (vol. 1), ecologie (vol. 5), oncologie (vol. 9), neurobiologie (vol. 4 și 12), imunologie (vol. 8). În seria respectivă s-au mai publicat atît volume cu o tematică mai largă — probleme matematice ale biologiei (vol. 2 și 13) sau ale științelor biomedicale (vol. 6) — precum și cu o tematică mai specială, cum sînt transportul ionilor prin membranele biologice (vol. 7), reacția Belousov-Jabotinski — (vol. 10) etc.

Prezentul volum, al 14-lea, are de asemenea o tematică bine definită, și anume aspectele biochimice ale proceselor de difuzie. Materialul cuprins în volum este constituit pe cursul ținut de autor studenților în biologie, interesați în probleme de biologia populațiilor și neurobiologie.

Autorul a intenționat ca, folosind cît mai puțin posibil instrumentul matematic, să facă o introducere în teoria proceselor stochastice, teorie la care se apelează din ce în ce mai des, atunci cînd e vorba de probleme de biologia populațiilor, sau neurobiologie.

Astfel, într-un capitol preliminar autorul definește unii parametri și procese, pentru ca apoi să trateze procesele de difuzie, precum și modelele discrete și continue, propuse pentru interpretarea acestor procese.

Ca exemplu de aplicare a teoriei proceselor de difuzie, autorul tratează problema transmiterii influxului nervos.

În general, cartea poate fi parcursă fără dificultăți prea mari, cu condiția ca cititorul să posede un minim de cunoștințe în domeniul calculului probabilităților și al calculului diferențial. Autorul s-a îngrijit ca cititorul să participe activ la asimilarea materialului cuprins în carte, prin intercalarea în text a unor exerciții și probleme de lucru, pe care cititorul este solicitat să le rezolve.

Desigur, procesele de difuzie reprezintă un subiect devenit clasic pentru biologie. Ceea ce aduce nou volumul de față este abordarea originală, din punct de vedere stochastic, a unor aspecte deosebit de actuale ale biologiei contemporane, cum sînt neurobiologia sau biologia populațiilor.

Constanța Mușolan

WOLFGANG FRITSCHE, *Biochemische Grundlagen der industriellen Microbiologie* (Bazele biochimice ale microbiologiei industriale), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978, 191 p., 65 fig., 8 tab., DDR 29,00 M.

Autorul a conceput cartea de față pornind de la ideea că optimizarea proceselor fermentative se poate face numai prin cunoașterea profundă a mecanismelor de reglare a metabolismului microorganismelor. Astfel, adresîndu-se în primul rînd specialistului ce lucrează direct în producția industrială microbiologică, autorul prezintă detaliat biochimia diferitelor fermentații, insistînd îndeosebi asupra problemelor biochimice ale biosintezelor industriale.

În primul capitol, autorul prezintă domeniile microbiologiei industriale (alimentație, medicină, agricultură, industria minieră, protecția mediului, etc.).

Al doilea capitol este o introducere în biochimia proceselor industriale microbiologice, acordîndu-se atenție cineticii creșterii și biosintezei produsului industrial, supraproducției, reglării metabolismului, controlului genetic.

Al treilea capitol este consacrat unor aspecte ale procesului tehnologic de fermentație.

Următoarele capitole se ocupă de diferite clase de produși obținuți în prezent de către microbiologia industrială, autorul insistînd cu precădere asupra aspectelor biochimice specifice fiecărei tehnologii în parte. Astfel, se discută problema producției de biomasă, a produșilor de fermentație (etanol, glicerină, acid lactic, 2, 3 butandiol, acetonă—butanol, metan), a metaboliților primari (aminoacizi —L— lizină, L-treonina, acid L-glutamic, acid citric, 5' nucleotide, vitamine — riboflavina, cobalamina), a enzimelor (optimizarea genotipică și fenotipică a producției), a transformărilor microbiene, a metaboliților secundari, recuperarea minereurilor sărace.

Cartea se încheie cu o listă bibliografică selectivă și un index de subiecte.

Stilul concis și relativ ușor accesibil al cărții este o garanție a bunei primiri de către cititorii interesați.

Constanța Mușolan

W. DEMTRÖDER, *Grundlagen und Techniken der Laser-spektroskopie.* (Bazele și tehnicile spectroscopiei cu laser) Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1977, 165 fig., 256 p., DM 38.

Cartea lui W. Demtröder este un manual care prezintă un domeniu de cercetare relativ nou, de interferență al fizicii și chimiei : spectroscopia cu laseri.

Spectroscopia a cunoscut în ultimii ani progrese mari datorită utilizării laserilor ca surse. Laserii, la rîndul lor, s-au perfecționat și diversificat putînd fi folosite ca surse de bandă îngustă, eventual acordabile. Astfel au devenit posibile cercetări care cu sursele clasice nu se puteau întreprinde din motive de intensitate și/sau rezoluție insuficiente. Laserii continui, acordabili nu necesită dispozitive de selectare a lungimii de undă dînd o rezoluție mai bună. Asociat cu tehnicile de amestecare a frecvenței, se pot realiza surse acordabile pentru orice frecvență de la UV la IR îndepărtat.

Numeroasele posibilități oferite de utilizarea laserilor în spectroscopie în domeniul cercetării structurii atomilor, moleculelor, corpurilor solide, plasmei au determinat o activitate de cercetare intensă pe acest tărîm însoțită de o adevărată avalanșă de lucrări și publicații.

Cartea de față se adresează fizicienilor, chimiștilor care doresc să abordeze domeniul spectroscopiei laser oferind informație la nivelul și de consistența adecvată unui cercetător care nu a mai lucrat în domeniu, prezentînd și o selecție a literaturii de specialitate.

Bazele electrodinamicii, opticii, fizica atomului, moleculei, fizica laserilor sînt presupuse cunoscute, fiind larg discutate acele proprietăți ale emisiei laser care sînt importante pentru utilizarea lor în spectroscopie ca : spectrul de frecvențe, lărgimea liniei, stabilitatea amplitudinii și frecvenței, acordabilitate etc. De asemenea sînt mai larg discutate unele detalii tehnice cunoștințe referitoare la componente și folosirea lor (prisme) rețele, oglinzi, monocromatoare, interferometre, detectori de fotoni precum și parametrii de calitate ca rezoluție, sensibilitate etc.).

Fiecare capitol este însoțit de exemplificări numerice, calcule pentru a explica și mai mult materialul prezentat.

La sfîrșitul cărții se găsește o selecție din literatura de specialitate referitoare la manualele fundamentale ce conțin cunoștințele premergătoare celor prezentate, publicații cu realizările de vîrf din domeniu și orientările de viitor, aplicații practice, detalii tehnice.

Gabriela Anghel

G. ADAM, P. LÄUGER, G. STARK, *Physikalische Chemie und Biophysik*, (Chimie-fizică și biofizică), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 217 fig., 465 p., U.S. $ 17,50.

Cartea lui Adam-Läuger-Stark este un manual din seria „Texte Universitare" a editurii „Springer Verlag" corespunzînd unui curs de chimie-fizică și biofizică adresat unor studenți la biologie.

Lucrarea reunește în mod programatic un domeniu clasic — cel al chimiei fizice — cu unul nou — cel al biofizicii. Autorii încearcă în limitele domeniilor abordate demonstrarea valabilității legităților și principiilor fizicii pentru lumea vie și nevie, peste delimitările istorice ale biologiei și fizicii. Cartea a fost concepută astfel încît să corespundă dezvoltării actuale a biologiei și biologiei moleculare avînd în cuprinsul său 11 capitole dintre care 5 de termodinamică și cîte unul de electrochimie, fenomene de suprafață, fenomene de transport, membrane biologice, cinetică chimică și biofizica radiațiilor.

Complexitatea structurală și funcțională extraordinară a entităților biologice face dificilă, cel puțin în etapa prezentă, descrierea microscopică a fenomenelor. Formularea macroscopică a legităților biologice corespunde însă metodelor termodinamicii. Importanța pe care o acordă autorii analizei energetice și termodinamice a proceselor biologice este reflectată și de numărul mare de pagini alocate. Definirea mărimilor termodinamice este urmată de discuții în legătură cu semnificația lor statică, principiile determinării lor exprimentale, unități de măsură, exemple numerice, descrierea unor sisteme biologice în termeni termodinamici. Pentru descrierea unor sisteme biologice particulare (embriogeneză, dezvoltarea ontogenică a organismului, carcinogeneză) sînt indicate publicațiile corespunzătoare. Un capitol întreg este consacrat problemelor sistemelor chimice cu mai multe componente, în particular soluțiilor, cu extinderea legilor termodinamicii pentru sisteme deschise, sisteme cu reacții chimice, schimbări de entalpie, entropie asociate cu reacțiile chimice.

Capitolele referitoare la fenomenele de suprafață (tensiune superficială, adsorbție superficială, mono și bistraturi lipidice) și fenomenele de transport (viscozitate, difuzie, sedimentare, difuzia ionilor, electroforeză) sînt tratate în spiritul fizicochimiei, insistîndu-se acolo unde este cazul asupra semnificației statistice a parametrilor utilizați.

Remarcabil pentru caracterul lui sintetic este capitolul consacrat biofizicii radiațiilor: sînt caracterizate principalele tipuri de radiații (electromagnetice, particule încărcate, neutroni, röntgen, gama) cu detalii legate de măsurarea lor, sînt discutate aspecte ale interacției radiațiilor cu materia, efectele biologice în general, asupra omului în particular.

Capitolele sînt însoțite de întrebări, probleme — răspunsurile, rezolvările fiind date la sfîrșitul cărții.

Fiecare capitol este însoțit de indicații din literatura de specialitate fiind recomandate cu precădere manuale referitoare la domeniul tratat. La sfîrșitul cărții sînt date sub formă de tabele unitățile de măsură din SI, unele constante fizice, elementele chimice în ordine alfabetică cu simbolul și greutatea lor atomică.

În ce privește simbolurile utilizate, autorii folosesc în mod declarat unele simboluri pentru desemnarea mai multor mărimi cu intenția de a obliga pe student să gîndească în concepte și nu în simboluri.

Gabriela Anghel

F. Pliquett, M. K. Solncev, *Fortschritte der Biophysik*, vol. 22, *Termoluminiszenz biologischer Object* (Termoluminiscența obiectelor biologice) Ed. G. Thieme, Leipzig, 1978, 92 p.

Numeroase dintre macromoleculele de interes biologic sînt capabile să emită radiație termoluminiscență adică să elibereze energia acumulată prin iradiere în condițiile unei ușoare încălziri.

Termoluminiscența (TL) materialelor biologice constituie un domeniu de vîrf al biofizicii fiind relativ puțin investigat pînă în prezent atît sub raport fundamental cît și al posibilităților de utilizare.

Termoluminiscența este o caracteristică de material și se schimbă odată cu diversele schimbări (fizice, chimice, biologice) suferite de materialul respectiv. Astfel, TL servește la investigarea unor probleme de structură și funcție al sistemelor biologice la nivel molecular precum și la descrierea unor modificări suferite de biomateriale cum ar fi cele patologice, cele de vîrstă, etc.

Lucrarea lui Pliquett și Solncev are scopul de a oferi o prezentare unitară a rezultatelor obținute pînă în prezent cu această tehnică pe biomateriale: molecule, macromolecule, fragmente de țesuturi de origine materială.

Cartea se adresează unor specialiști prezentînd bazele fizice ale termoluminiscenței, amănunte referitoare la tehnica experimentală și instalația necesară, rezultate obținute pînă în prezent și discuții referitoare la posibilitățile de utilizare în domeniul biochimiei și biologiei. Cartea fiind adresată unor biofizicieni, problemele teoretice sînt tratate pe scurt presupunîndu-se cunoscute anumite capitole de fizică.

Lucrarea este dificil de urmărit fără cunoştinţe de fizica semiconductorilor, modelele şi teoriile fiind prezentate în formalismul obişnuit acestei specialităţi şi fără să se insiste asupra definirii şi discutării mărimilor şi parametrilor folosiţi. Se poate deci spune că lucrarea se adresează unor specialişti din domeniile amintite, care doresc să se informeze în legătură cu posibilităţile de utilizare a metodelor de termoluminiscenţă în biologie, biochimie, cerinţe speciale referitoare la aparatură. Remarcăm ca deosebit de interesant capitolul final de consideraţii relativ la posibilităţile de utilizare mai largi, de viitor ale TL.

Cartea, relativ puţin voluminoasă, se bazează pe o exigentă selecţie a literaturii de specialitate în domeniu fiind însoţită de o bogată listă de indicaţii bibliografice.

Gabriela Anghel

Lipids and lipid polymers in higher plants (Lipidele şi polimeri de lipide din plantele superioare) editori M. TEVINI şi H. K. LICHTENTHALER, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1977, 308 p., 136 Fig.

Această carte conţine un număr de lucrări care au fost prezentate în cadrul simpozionului de „Lipide şi polimeri ai lipidelor din plantele superioare", ţinut în iulie 1976 la Inst. Botanic al Universităţii din Karlsruhe. Simpozionul a fost organizat de prof. E. Heinz. H. K. Lichtenthaler, H. K. Mangold şi M. Tevini printre care se află şi editorii acestei cărţi.

Lucrările se referă la biosinteza, distribuţia, funcţia şi fiziologia diferitelor lipide din plantele superioare şi rolul biomembranelor şi al pereţilor celulelor epidermale.

Volumul conţine 16 capitole în 5 secţiuni, astfel :

— prima parte cuprinde trei capitole ce se referă la funcţia, organizarea şi compoziţia în lipide a biomembranelor ;

— partea a II-a a volumului cuprinde patru capitole despre fiziologia şi biochimia acizilor graşi şi gliceridelor ;

— în următoarele două secţiuni sînt descrise probleme de fiziologie şi biochimie a steroizilor în plante şi a prenylpidelor.

Prenylipidele din plantele superioare sînt de origine terpenoidă (simple) de ex. carotenoide sau părţi de terpenoide şi non-terpenoide (în amestec).

Aceeaşi secţiune cuprinde lucrări ce se referă la biosinteza şi semnificaţia biologică a prenolilor şi a derivaţilor fosforilaţi, reglarea sintezei prenylquinonelor în plantele superioare.

Ultima parte se referă la biosinteza şi degradarea polimerilor lipidelor şi structura intermoleculară în unele plante.

Volumul aduce contribuţii însemnate la dezvoltarea cercetărilor de biochimie şi fiziologie în ceea ce priveşte metabolismul lipidic.

Rodica Bîrnescu

BRAITENBERG. V., *On the Texture of Brains. An Introduction to Neuroanatomy for the Cybernetically Minded.* (Asupra structurii creierului. O introducere în neuroanatomie din punct de vedere cibernetic) Springer Verlag. New York, Heidelberg, Berlin. 1977, ISBN 0—387—08391—x, 37 fig., 127 p., 16,30 DM.

Cartea pofesorului dr. Valentino Braitenberg, Directorul Institutului Max Planck pentru Cibernetică Biologică analizează pe scurt interpretarea cibernetică a structurii şi funcţiilor creierului. Scrisă într-un limbaj ştiinţific elevat, cu frecvente tonalităţi filozofice, cartea reprezintă totodată şi o sinteză a numeroaselor contribuţii originale ale autorului în biocibernetica sistemului nervos. Datele clasice şi recente ale neuroanatomiei şi neurofiziologiei sînt folosite pentru descrierea şi interpretarea structurii şi funcţionării reţelelor neuronale, elemente cheie ale computerelor neuronale. Analizatorul vizual şi sistemul de pilotaj automat al insectelor, cortexul cerebral şi cerebelos al mamiferelor sînt analizate din punct de vedere biocibernetic, ele constituind totodată modele de computere biologice. Cartea se adresează tuturor celor care prin activitatea lor lucrează în diverse domenii ale ştiinţelor creierului : neuroanatomie, neurofiziologie, neurobiochimie, neurobiologie, neurocibernetică, psihologie.

Dan Riga

Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 19, editor S. Levin ; *Measuring Selection in Natural Populations* (Măsurarea selecției în populațiile naturale) de F. B. Christiansen și T. M. Fenchel Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1977, 564 pag.

Volumul conține lucrările simpozionului ce a avut loc în Danemarca, Sandbjerg Manor House, în anul 1976, dedicat memoriei profesorului Ove Frydenberg. În cadrul acestui simpozion au fost prezentate un număr de 32 comunicări științifice împărțite pe cinci secțiuni și anume : studiul selecției, studiul polimorfismului, sexul și evoluția, ecologia și evoluția omului, Din simpla enumerare a acestor secțiuni se poate desprinde gama largă de probleme abordate.

În prima secțiune un număr de 9 comunicări științifice se referă la probleme legate de selecția sexuală la *Tetraopes tetraophthalmus*, genetica populației de *Zoarces viviparus*, încercări de măsurare a selecției prin modificarea frecvenței genelor în populațiile naturale, selecția sexuală și evoluția teritorialității la păsări.

În secțiunea referitoare la polimorfism este abordată problema polimorfismului și selecției la *Pleuronectes platessa*, asociații neîntîmplătoare între allozime în populațiile naturale de *Drosophila melanogaster*, model general de evidențiere a variației enzimelor în populațiile naturale.

Secțiunea referitoare la sex și evoluție tratează particularități legate de sex la plante și animale, genetica populației, demografia și raportul sexelor, selecția și diferențierea genetică în populațiile partenogenetice.

În cadrul secțiunii — *Ecologia și evoluția* — lucrările prezentate s-au referit pe de-o parte la sisteme de măsurare a selecției naturale iar pe de altă parte la aspecte privind coevoluția în sistemele ecologice, selecția și competiția interspecifică, înțelegînd prin ea competiția, predaționismul, simbiosa — incluzînd parazitismul și mutualismul. Modelarea relațiilor ce se stabilesc în cadrul acestor raporturi reprezintă una din direcțiile de bază în ecologie, modele ce fac previziuni privind atingerea echilibrului stabil. Speciile care coexistă la un punct de echilibru stabil prezintă abundențe care reprezintă funcții ale parametrilor în cadrul modelului.

Selecția și variabilitatea non-Mendeliană precum și estimarea caracteristicilor variantelor rare reprezintă aspecte prezentate în cadrul secțiunii referitoare la evoluția omului

Marin Falcă

Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 17, editor S. Levin ; *Stochastic Problems in Population Genetics* (Probleme stochastice în genetica populației) de Takeo Maruyama, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 245 pagini,

Lucrarea bazată pe notele de curs ale autorului ținute la Universitățile din Houston și Wisconsin în 1974 și respectiv în 1976, explorează probleme privind genetica populațiilor și evoluția, utilizînd procese stochastice, modele biologice și alte procedee matematice, Pentru biologi, procesele stochastice sînt mai greu accesibile și în acest sens trebuie subliniat efortul autorului de a trata subiectul în așa fel încît conținutul științific al problemelor abordate să fie însușit atît de către studenții biologi, cărora le-a fost adresat, cît și de către cercetătorii specialiști în genetică sau în alte domenii ale biologiei.

Pentru înțelegerea mai exactă a acestei lucrări cîteva elemente privind conținutul ei considerăm că se impun.

Abordînd problema modelelor populației genetice autorul descrie și caracterizează modelele Wright, Feller și Moran, un model al dominanței, un model de mediu întîmplător, precum și alte procese legate de densitate, frecvență și timp.

Sînt tratate, de asemenea, aspecte privind structura geografică a populațiilor, populații uni- și bidimensionale, distribuții de frecvență ale genelor, distribuția integralelor stochastice.

Pentru parcurgerea și înțelegerea acestei lucrări, o pregătire matematică este absolut necesară.

Marin Falcă

IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man : Some Fumigants, the Herbicides 2,4—D and 2, 4, 5 — T, Glorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic al unor sub-

stanţe chimice la om : Unele substanţe fumigene, 2,4—D- şi 2, 4, 5-T — ierbicide, dibenzodioxine clorurate şi diferite chimicale industriale), Volume 15, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977 ; 354 p.

Volumul reprezintă punctele de vedere ale Grupului de lucru IARC, întrunit la Lyon, între 8—15 februarie 1977.

După capitolele introductive, în care sînt prezentate maniera de lucru a grupului de experţi, principiile pentru evaluarea riscului carcinogenic, modul de ordonare a monografiilor, — se indexează substanţe dintre cele mai diverse — volumul de faţă nu este unitar sub acest aspect — menţionîndu-se de fiecare dată caracteristicile fizice şi chimice, analitice, producţia mondială, utilizarea, existenţa în natură. Se acordă atenţie datelor biologice utile pentru evaluarea riscului carcinogenic la animale de laborator — neoplasm experimental — şi la om, După tratarea în acest fel a fiecărei substanţe considerate — urmează bibliografia necesară.

Sînt trecute în revistă substanţe fumigene antifungice (1,2-dibrom-etan, iod-metan), ierbicide şi cu acţiune antibacteriană (dibenzodioxine clorurate), defoliante (acid 2, 4, 5-triclorofenoxi-acetic şi esteri ai săi), aditivi la cauciuc sau mase plastice (1, 2- bis (clormetoxi)-etan), solvenţi (hexametil-fosforamidă), intermediari industriali de sinteză (eozină, izopropanol) etc.

Vl. Gheordunescu

Directory of on — going research in cancer Epidemiologiy (Indexul cercetării actuale în epidemiologia cancerului), IARC Scientific Publications No. 17, C. S. Muir & G. Wagner, eds, International Agency for Research on Cancer—Deutsches Krebsforschungszentrum, Lyon, 1977 ; 599 p.

Acest volum indexează proiectele de cercetare în domeniul cancerului (începînd din 1971), menţionîndu-le în rezumat (908 proiecte de cercetare), în ordinea alfabetică a ţărilor respective, apoi în ordinea tipurilor de cancer şi a modurilor de abordare a studiilor.

De asemenea, volumul cuprinde o listă a cercetătorilor implicaţi, o listă de termeni şi o listă a statisticilor naţionale şi sub-naţionale privind cancerul.

Prin sintezele pe care le cuprinde, volumul este un index util tuturor cercetătorilor din domeniul cancerului.

Vl. Gheordunescu

Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Transport in plants III, Intracellular Interactions and transport processes (Interacţiunile intracelulare şi procesele de transport), editori C. R. STOCKING, U. HEBER, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 464 p., 123 figs.

Mecanismele de transport al apei şi substanţelor în organismele vegetale continuă să reprezinte probleme de mare actualitate. În ultimii ani se încearcă tot mai mult analizarea diferitelor procese celulare atît prin prisma rolului fiecărui organit celular în parte cît şi prin multiplele sale interrelaţii funcţionale cu celelalte organite. Elucidarea caracteristicilor structurale, biochimice, biofizice ale biomembranelor a permis înţelegerea modului de realizare a schimburilor de metaboliţi între diferitele organite ale celulei, reliefîndu-se astfel, interacţiunile îşi interdependenţele dintre acestea în realizarea diferitelor procese metabolice.

Cu tot volumul mare de date acumulate în ultimii ani, pînă în prezent nu s-a reuşit realizarea unei monografii care să recunească în cuprinsul său aspectele cele mai importante legate de căile şi mecanismele transportului intracelular. Meritul volumului de faţă constă în aceea că pornind de la un material informaţional atît de vast a reuşit în cadrul celor patru părţi ale sale să realizeze o sinteză cuprinzătoare a cunoştinţelor de pînă acum din acest domeniu.

În prima parte se face o succintă trecere în revistă a caracteristicilor biomembranelor, componente esenţiale ale celulelor de orice tip.

Cea de-a doua parte, de alt fel şi cea mai amplă a volumului, analizează pe larg fiecare organit celular major prin prisma multiplelor sale legături funcţionale cu celelalte organite. Se acordă atenţie plastidelor în legătură cu procesele de transport, interacţiilor dintre organitele implicate în procesele de fotorespiraţie. Sînt discutate de asemenea, interrelaţiile citoplasmă-

vacuom, fenomenele de autofagie celulară și vacuolele ca parte componentă a sistemului lizozomal al celulei vegetale. În unele situații în care cunoștințele din domeniul celulei vegetale sînt deficitare, se apelează la sistemele animale.

Partea a treia a volumului este consacrată proceselor implicate în conservarea energiei și a schimburilor energetice între diferitele componente celulare. Se analizează în detaliu transportul de ioni și conservarea energiei la nivelul plastidelor și al mitocondriilor.

Ultima parte a volumului prezintă aspecte teoretic-matematice și analiza termodinamică a proceselor de transport.

Apreciem că volumul de față reprezintă o lucrare de sinteză deosebit de valoroasă care a reușit să analizeze și să prezinte într-un tot unitar diferitele curente actuale legate de procesele atît de însemnate ale transportului intracelular.

Aurelia Brezeanu

Molecular Biology Biochemistry and Biophysics 24, *„Chemical Relaxation in Molecular Biology"* (Relaxarea chimică în biologia moleculară), editată de I. Pecht și R. Rigler, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1977, 418 pag., 141 fig., $ 35.20.

Relaxarea chimică constituie în prezent un domeniu al cercetării ce poate aduce informații prețioase prvind dinamica unor sisteme cu un mare grad de complexitate, cum sînt de exemplu sistemele biochimice. Din acest motiv, la studiul relaxării chimice, s-a apelat pentru explicarea mecanismelor de formare a legăturilor de hidrogen și de susbtituție a unor ioni metalici în compuși de interes biologic, în explicarea legării bazelor la formarea nucleotidelor, a plierii proteinelor, în studiul izomerizării proteinelor și acizilor nucleici, în studiul interacțiilor proteină-proteină, enzimă-substrat, anticorp-haptenă sau în studiul transportului ionic prin membrane.

Toate aceste probleme constituie tema monografiei redactate de mai mulți specialiști de renume.

Materialul propriu zis privind aplicațiile în biologie este precedat de o introducere explicită privind teoria relaxării chimice, iar fiecare capitol (din cele unsprezece ale cărții) cuprinde cele mai noi cuceriri și perspective în metodologie.

Caracterul global al lucrării este orientat spre explicarea legilor ce guvernează dinamica reacțiilor chimice în sistemele biologice. Prin acest aspect, lucrarea se adresează unui cerc larg de cercetători chimiști, biochimiști, biologi, biofizicieni.

Șerban Moldoveanu

HEINZ DAVID, *Quantitative Ultrastructural Data of Animal and Human Cells* (Date cantitative ultrastructurale asupra celulelor animale și umane), VEB Georg Thieme Leipzig, 1977, 495 pag., 695 tab., 119,50 DDR Mark.

Cartea scrisă de Heinz David este o culegere de date privind celulele și componentele lor, substanțele extracelulare precum și diverse țesuturi și organe la anumite animale și la om.

Numărul impresionant de date este organizat judicios și sistematic. În primul capitol sînt prezentate dimensiuni ale diverselor celule normale și patologice la om și animale, timpi medii de viață, timpi de turnover, precum și date asupra organitelor celulare. Citățm pentru exemplificare tabelele privind dimensiunile nucleilor, componentele cromozomiale, date privind nucleolii, porii nucleari, membranele celulare, distribuția și dimensiunile ribozomilor, volumul sau diametrul mitocondrial, suprafața membranei mitocondriale, caracteristicile aparatului Golgi la celule din diferite țesuturi la om, șobolan etc.

Datele structurale privind țesuturile și organele se referă la : ficat și bilă, pancreas exocrin, sistem digestiv urinar respirator, nervos, senzorial, piele și glande aferente, sistem hematopoetic, glande endocrine, sistem de reproduéere, țesut muscular, cardiac, vascular, oase, cartilagii și dinți.

Complexitatea și completitudinea materialului prezentat sînt suplimentate de corelarea datelor biochimice cu cele structurale și de încercarea de a compara diverse metode morfometrice în intenția de a da o imagine cît mai unitară problemei privind datele ultrastructurale.

De aceea, lucrarea poate fi considerată ca o încercare de a iniția o nouă etapă în studiul celulei, reunind date morfologice care să permită interpretări calitativ mai corecte.

Lucrarea constituie, prin bogăția materialului, o sursă deosebit de utilă de informații pentru biologi, biochimiști și medici.

Zina Moldoveanu

Mitosis Facts and Questions (Mitoza, fapte și întrebări), Proceedings of a Workshop held at the Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany, April 25—29, 1977. Ed. by M. Litte, N. Paweletz, C. Petzelt, H. Ponstingl, D. Schroeter, H. P. Zimmermann, Administrative Editor Vera Runnstrom-Reio, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.

Cu trei ani în urmă, aproximativ 20 de cercetători ai Centrului German de Cercetare a Cancerului din Heidelberg s-au întrunit neoficial spre a discuta ampla problemă a mitozei. Rezultatele acestei reuniuni au constituit punctul de plecare în vederea organizării unei întîlniri pe scară mult mai largă. Astfel, între 25—29 aprilie 1977, s-a organizat la Centrul German de Cercetarea Cancerului din Heidelberg un seminar cu tema „*Mitoza: fapte și întrebări*" conținutul său fiind publicat în volumul de față.

În prima parte a acestui volum sînt prezentate 9 prelegeri ce se circumscriu problematicii ridicate de amplul proces al mitozei. Sînt redate astfel o serie de aspecte privind ultrastructura celulelor mitotice, semnalele de suprafață și reglarea celulară a creșterii, rolul mitozei în diferențiere, morfogeneză și cancer, mitoza in vitro, modele ale aparatului mitotic. Ultima prelegere pune o serie de probleme ce se ridică în fața cercetărilor viitoare ale procesului mitozei privind fiziologia ciclului mitotic, modificările ce se petrec în celula privită ca un tot la trecerea acesteia prin întregul ciclu al mitozei. Se subliniază de asemenea importanța pe care o va reprezenta studiul mai aprofundat în viitor a unor cicluri biochimice ca : ciclul tiolic, ciclul ATP-azei activată de Ca.

Fiecare din cele 9 prelegeri este urmată de ample discuții purtate cu discernămînt de un mare număr de participanți.

În final volumul cuprinde o serie de 33 de rezumate ale unor lucrări prezentate de către participanții la seminar.

Considerăm volumul de față ca un strălucit mod de a prezenta într-o adevărată sinteză imensul material acumulat pînă în prezent în acest domeniu al mitozei și de a reda perspectivele și întrebările ce se ridică în fața cercetărilor viitoare.

Ofelia Gozia

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţie, etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : 78171 Bucureşti 2, P.O.B. 1002.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, Biochimia contracţiei musculare, 1970, 240 p., 20,50 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, Biologie celulară, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, Fotosinteza, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, Natura şi structura materiei vii, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

V. I. DEACIUC, Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, Chimia algelor marine, 1974, 212 p., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, Mecanismul de acţiune al hrmornilor steroizi, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU, Istoria ştiinţelor în România-Biologia, 1975, 287 p., 13,50 lei.

ELENA GABRIELESCU, Neuroproteazele, 1978, 157 p., 22 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 21, NR. 2, P., 131–242, BUCUREŞTI, IULIE-DECEMBRIE, 1978

43816

I. P. „Informaţia" – c. 539

Lei 20. —